

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Wolfgang Wagner
aus: Karlsruhe

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Aktivierung und Inaktivierung des Cry8C-Toxins von
Bacillus thuringiensis japonensis Stamm Buibui
im Darmsystem von Engerlingen (Scarabaeidae)

Gutachter: Prof. Dr. Werner A. Müller

Prof. Dr. Hans Ulrich Schairer

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Werner A. Müller (Direktor des Zoologischen Instituts der Universität Heidelberg) für die langjährige Betreuung meiner Arbeit und seine konstruktive Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Hans Ulrich Schairer (Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg, ZMBH) für seine ständige Diskussionsbereitschaft und viele wichtige Hinweise.

Herrn Dr. Wolfgang Schnetter für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, seine Fähigkeit, Mitarbeiter zu motivieren, sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Walter Stöcker (Institut für Zoophysiology, Universität Münster) für seine wertvollen Tipps bei der Charakterisierung der Darmsaft-Proteasen.

Dem Doktoranden Frank Möhrlen für die Zusammenarbeit bei der Charakterisierung des Maikäfer-Astacins, der Bereitstellung von Laborgeräten und vielen hilfreichen Ratschlägen.

Herrn Dr. David Lopes (Departamento de Ciências Agrarias, Universität der Azoren, Portugal) für die Bereitstellung von Engerlingen des Japankäfers, sowie Herrn Dr. Friedrich Bischof (Regierungspräsidium Karlsruhe) für die Erteilung der Einfuhrgenehmigung.

Herrn Dr. Ralf Bischoff und Herrn Jürgen Kretschmer (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, DKFZ) für die Bereitstellung von HPLC-Zubehör und die technische Unterstützung.

Herrn Dr. Tore Kempff (DKFZ) für das N-terminale Ansequenzieren von Polypeptiden.

Herrn Dr. Michael Friedrich (MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) und Herrn Dr. Andreas Brune (Mikrobielle Ökologie, Universität Konstanz), die durch ihre Arbeiten an der Ökologie von Darmmikrobiota uneigennützig wichtige Zusatzinformationen zur Charakterisierung des Redoxpotentials lieferten.

Den Doktoranden Martin Berner und Christian Hahn für ihre Hilfe bei der Tiermaterialbeschaffung und ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Oliver Abel für Vorarbeiten bei der Aufreinigung des Cry8C-Toxins und vergleichender proteolytischer Abbaueversuche mit käuflichen Proteasen im Rahmen seiner Staatsexamensarbeit.

Dem Ministerium für Ernährung und ländlichen Raum des Landes Baden-Württemberg und der Landesanstalt für Pflanzenschutz in Stuttgart (Dr. Meinert; M. Fröschle) für die Unterstützung und finanzielle Förderung der Arbeitsgruppe.

Dem Land Baden-Württemberg für die finanzielle Unterstützung im Rahmen meines Stipendiums nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz.

Publikationen

Wagner W. (1999): Untersuchungen zur Wirkungsweise von *Bacillus thuringiensis* ssp. *japonensis* gegen *Melolontha melolontha* (Scarabaeidae). Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Wagner W., Krieger L., Schnetter W. (2000): Why is the scarab specific *Bacillus thuringiensis* ssp. *japonensis* strain Buibui inefficient against *Melolontha melolontha*? Integrated Control of Soil Pest, subgroup “*Melolontha*”, IOBC wprs Bulletin 23 (8), 55-60

Wagner W., Schnetter W. (2001): Proteasen im Darmsaft des Feldmaikäfers (*Melolontha melolontha*) und Abbau des Cry8C-Toxins von *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui, Mitt. DGaaE 13, 169-172

Schnetter W., Wagner W. (2002): Bakterien als Antagonisten von Maikäfer-Engerlingen. Laimburg Journal 1(2), in press

Wagner W., Möhrle F., Schnetter W. (2002): Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). Insect Biochem. Molec. Biol. 32 (7), 803-814

Wagner W., Schnetter W. (2002b): Proteolytic activation and inactivation of Cry8C from *Bacillus thuringiensis japonensis* Buibui by proteolytic enzymes in the midgut juice of *M. melolontha*. Integrated Control of Soil Pest, subgroup “*Melolontha*”, IOBC wprs Bulletin, in press

Literaturverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	<u>BACILLUS THURINGIENSIS</u>	1
1.1.1	<u>Charakterisierung</u>	1
1.1.2	<u>Wirtschaftliche Bedeutung von BT</u>	3
1.1.3	<u>Bacillus thuringiensis japonensis</u>	4
1.2	<u>DER MAIKÄFER ALS SCHADORGANISMUS</u>	4
1.3	<u>ZIELE DER PROMOTION</u>	6
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	7
2.1	<u>BEREITSTELLUNG DES TOXINS</u>	7
2.1.1	<u>Bacillus thuringiensis japonensis Stamm Buibui</u>	7
2.1.2	<u>Anzucht der Bakterien und Isolation der Kristalle</u>	7
2.1.3	<u>NaBr-Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung der Toxinkristalle</u>	7
2.1.4	<u>Lösen und Reinigen des Toxins</u>	7
2.1.5	<u>Endogene Proteasen</u>	8
2.2	<u>VOM TIERMATERIAL BIS ZUM REINIGEN DER PROTEASEN</u>	8
2.2.1	<u>Insektenkultur</u>	8
2.2.2	<u>Biotests</u>	9
2.2.3	<u>Statistik</u>	10
2.2.4	<u>Präparation des Darmsafts</u>	11
2.2.5	<u>Präparation der Darmabschnitte</u>	11
2.2.6	<u>Präparation von „Brush border membrane vesicles“ (BBMV)</u>	12
2.2.7	<u>Freisetzung der BBMV-Aktivitäten</u>	12
2.2.8	<u>Säulenchromatographien: Vorgehensweise bei der HPLC-Anlage</u>	13
2.2.9	<u>Reinigung der Darmsaft-Proteasen</u>	14
2.3	<u>ANALYSE VON PROTEASEN</u>	16
2.3.1	<u>Substrate und Inhibitoren</u>	16
2.3.2	<u>Photometrische/Fluorometrische Aktivitätstests</u>	16
2.3.3	<u>Messungen mit einem dansylierten Oligopeptid-Substrat</u>	17
2.3.4	<u>Aktivitätsblots</u>	17
2.3.5	<u>Zymogramme</u>	18
2.4	<u>WEITERE CHARAKTERISIERUNG DES DARMMILIEUS</u>	19
2.4.1	<u>pH-Messungen</u>	19
2.4.2	<u>Redoxpotentialmessungen in situ und in vitro</u>	19
2.4.3	<u>Phenoloxidase-Aktivitätstest</u>	21
2.5	<u>TOXIN UND PROTEASEN</u>	21
2.5.1	<u>Proteolytische Versuche</u>	21
2.5.2	<u>SDS-PAGE und Auswertung der Banden</u>	21
2.6	<u>WEITERE TECHNIKEN</u>	22
2.6.1	<u>Dialyse</u>	22
2.6.2	<u>Proteinkonzentrationsbestimmung</u>	23
2.6.3	<u>Western Blot</u>	23
2.6.4	<u>Analyse N-terminaler Peptidsequenzen</u>	23
2.7	<u>COMPUTERGESTÜTZTE INFORMATIONSSUCHE UND LITERATURRECHERCHE</u>	24

3	<u>ERGEBNISSE</u>	26
3.1	<u>CHARAKTERISIERUNG DER PROTEASEN IM MITTELDARM VON <i>M. MELOLONTHA</i></u>	26
3.1.1	<u>Identifizierung der Endopeptidasen im Darmsaft</u>	26
3.1.2	<u>Spezifität der Darmsaft-Proteasen</u>	27
3.1.3	<u>Membranständige Proteasen</u>	32
3.1.4	<u>Aufreinigung und N-terminale Ansequenzierung des Maikäfer-Astacins</u>	34
3.2	<u>VERGLEICH DER PROTEASEN VERSCHIEDENER SCARABAEIDEN-DARMSÄFTE</u>	36
3.3	<u>CHARAKTERISIERUNG DER PROTEASEN IM MITTELDARM VON <i>P. JAPONICA</i></u>	39
3.4	<u>REDOXPOTENTIAL</u>	44
3.4.1	<u>Redoxpotentialmessungen bei <i>M. melolontha</i> und <i>P. japonica</i></u>	44
3.4.2	<u>Phenoloxidase-Aktivitätsmessungen</u>	46
3.4.3	<u>Künstliche Erzeugung der reduzierenden Bedingungen</u>	47
3.5	<u>DIE ENDOGENE PROTEASE VON BTJ</u>	48
3.6	<u>PROZESSIERUNG VON CRY8C</u>	50
3.6.1	<u>Isolierung einzelner Proteasen bzw. –Gruppen des Darmsafts</u>	50
3.6.2	<u>Lösen der Toxinkristalle und proteolytische Aktivierung zu 65 kDa</u>	54
3.6.3	<u>Proteolytische Prozessierung des 65 kDa Toxins zu 55 kDa</u>	56
3.6.4	<u>Abbauverhalten des 65 kDa Toxins unter Detergens-Bedingungen</u>	58
3.6.5	<u>Abbau des 65 kDa Toxins unter reduzierenden bzw. chaotr. Bedingungen</u>	60
3.6.6	<u>Prozessierung durch teilgereinigte Proteasen</u>	63
3.7	<u>BIOTESTS</u>	65
3.7.1	<u>Biotests mit <i>P. japonica</i></u>	65
3.7.2	<u>Biotests mit <i>M. melolontha</i></u>	65
3.7.3	<u>Erhöhung des Redoxpotentials und Biotests</u>	66
4	<u>DISKUSSION</u>	68
4.1	<u>PROTEASEN</u>	68
4.1.1	<u>Allgemeines</u>	68
4.1.2	<u>Serinproteasen</u>	68
4.1.3	<u>Metalloproteasen und speziell Astacin</u>	70
4.1.4	<u>Aminopeptidasen</u>	72
4.1.5	<u>Proteasen weiterer mechanistischer Klassen</u>	73
4.1.6	<u>Multiple Aktivitäten</u>	73
4.1.7	<u>Vergleich der untersuchten Scarabaeiden-Darmsäfte</u>	74
4.2	<u>REDOXPOTENTIAL</u>	75
4.2.1	<u>Allgemeines</u>	75
4.2.2	<u>Ursachen für die Entstehung eines niedrigen Redoxpotentials</u>	75
4.2.3	<u>Wozu braucht <i>M. melolontha</i> ein niedriges Redoxpotential?</u>	79
4.2.4	<u>Worin sich der Darmsaft von <i>P. japonica</i> unterscheidet</u>	80
4.3	<u>ABBAU DES KRISTALLTOXINS VON BTJ</u>	81
4.3.1	<u>Voraussetzungen zum Lösen der Kristalle</u>	81
4.3.2	<u>Endogene Proteasen und die Aktivierung des Protoxins</u>	82
4.3.3	<u>Der weitergehende Abbau durch die Darmsaftproteasen</u>	84
4.3.4	<u>Sequenzanalyse der Abbaufragmente</u>	85

<u>4.4</u>	<u>BIOTESTS</u>	88
<u>4.5</u>	<u>RESISTENZ</u>	90
<u>4.5.1</u>	<i>Warum ist das Resistenzproblem so wichtig bei BT?</i>	90
<u>4.5.2</u>	<i>Bedeutung des Resistenzmechanismus bei M. melolontha</i>	90
<u>4.5.3</u>	<i>Kommen bei M. melolontha weitere Resistenzmechanismen in Frage?</i>	91
<u>4.6</u>	<u>AUSBLICK</u>	93
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	94
<u>6</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	95

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden die Mechanismen untersucht, die zur Inaktivierung des Scarabaeiden-spezifischen Cry8C-Kristalltoxins von *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui bei den Larven des Feldmaikäfers (*Melolontha melolontha*, Scarabaeidae) führen. Hierzu werden die Darmphysiologie von *Melolontha*-Larven und die proteolytischen Abbauprozesse des Toxins analysiert und die Ergebnisse mit den BTJ-sensitiven Larven den Japankäfers (*Popillia japonica*) verglichen.

1.1 *Bacillus thuringiensis*

1.1.1 Charakterisierung

Bacillus thuringiensis (BT) ist ein Gram-positives, sporenbildendes Bakterium. Es ist nahe verwandt mit *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. anthracis* und *B. subtilis*. Vertreter dieser Stämme bilden Toxine, die gegen die verschiedensten systematischen Tiergruppen gerichtet sein können, auch gegen den Menschen. Am bekanntesten dürfte der Anthrax-Erreger *B. anthracis* sein, dessen Toxin als Atem-, Kontakt- u. Enterotoxin wirkt und leider auch als biologischer Kampfstoff angewendet werden kann.

Die Wirkung von BT beschränkt sich hingegen auf Insekten und einige wenige andere Organismen (Glare 2000). Hierzu gehören Lepidopteren, Dipteren, Coleopteren, Hymenopteren, Hemiptera, Mallophaga, Nematoda und Protozoa. Die Besonderheit bei BT besteht darin, dass man diese Bakterienart in verschiedene Stämme untergliedern kann, die jeweils spezifisch nur gegen einige wenige systematische Gruppen bzw. einzelne Arten als Frassgifte wirken, wobei in der Regel nur die Larven geschädigt werden (Lecadet 1967; Milne 1993). Hierdurch erlangt es Bedeutung als Bioinsektizid, indem es gezielt gegen herbivore Insekten in der Land- u. Forstwirtschaft eingesetzt werden kann und im Gegensatz zu breit wirkenden chemischen Insektiziden unbeteiligte Tiere, Nützlinge und den Menschen schont.

Die Wirkungsspezifität der einzelnen BT-Stämme kann auf die unterschiedlichen sog. Cry-Toxine zurückgeführt werden, die in der stationären Phase als Protoxine gebildet werden und zu parasporalen Proteinkristallen zusammengelagert werden (Abb. 1.1). Die systematische Klassifikation und Nomenklatur der Toxine erfolgt durch eine hierarchische Anordnung aufgrund von Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten (Crickmore 1998).

Die Kristalle werden am Ende der Sporulation durch Autolyse des Sporangiums freigesetzt und gelangen bei der Nahrungsaufnahme in den Mitteldarm des Zielinsekts. Dort werden sie abhängig von den vorherrschenden physiologischen Bedingungen (hoher pH-Wert, reduzierende Bedingungen etc., siehe Kap. 4.3.1) gelöst. Hierzu müssen intermolekulare Disulfidbrücken und ionische Bindungen getrennt werden (Li 1991), die beim Protoxin v. a. im C-terminalen Bereich zu finden sind. Dieser wird durch endogene Proteasen des Bakteriums oder durch Darmsaft-Proteasen des Insekts abgespalten. Der übrig bleibende N-terminalen Abschnitt ist das aktive Toxin (50-70 kDa), das in der Regel nicht weiter abgebaut wird. Ein Sonderfall ist das Cry3A-Toxin von *B. t. tenebrionis*, dem der C-Terminus weitgehend fehlt und das somit leichter gelöst werden kann, nämlich auch bei sauren pH-Werten (Franken 1994).

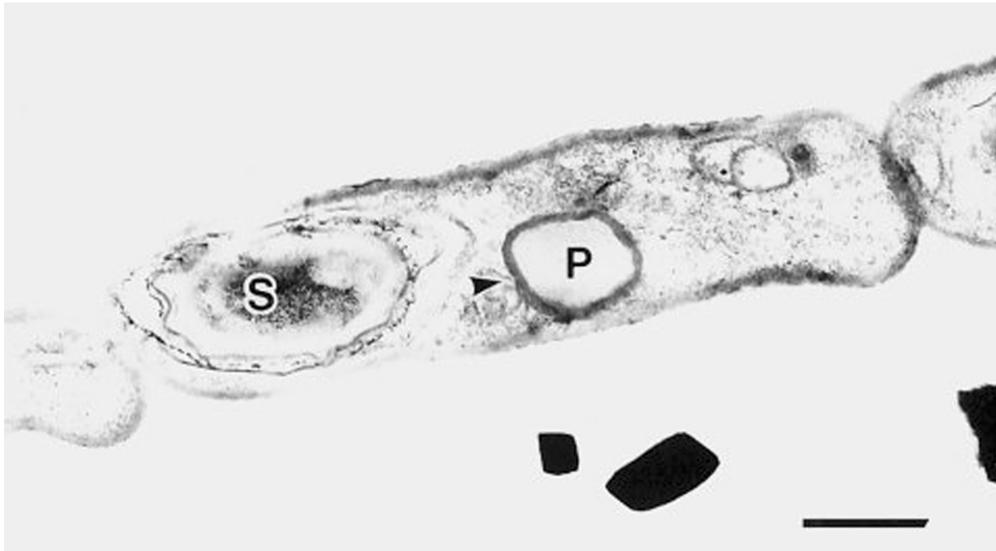


Abb. 1.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme des Sporangiums von *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui. S, Spore; P, parasporaler Proteinkristall mit Cry8C-Protoxin; Länge der Linie: 500 nm. Abbildung nach Wasano (2000).

Die weiteren Studien zur Wirkungsweise des Cry-Toxins wurden vor allem an Larven von Lepidopteren und Dipteren durchgeführt. Bei diesen Insekten bindet das jeweilige Toxin spezifisch und reversibel an einen Rezeptor im apikalen Epithel einer Mitteldarmzelle. Hierbei kann es sich, abhängig von der Insektenart, um eine Aminopeptidase N (Ellar 1994) oder ein Cadherin-artiges Membranprotein handeln. Im weiteren Verlauf ändert sich die Konformation des Toxins so, dass es zu einer irreversiblen Insertion eines hydrophoben Hairpins in die Lipidmembran kommt. Durch eine oligomere Zusammenlagerung mit weiteren Toxinmolekülen entstehen Kanäle durch die Zellmembran. Dadurch kommt es zu Störungen im osmotischen Gleichgewicht der Epithelzelle (Sacchi 1986): Durch einen erhöhten Einstrom von monovalenten Kationen und Wasser schwillt die Zelle an und platzt. Durch diese Cytolyse wird die Darmwand perforiert. Hierdurch können BT und darmeigene Mikroorganismen in die Hämolymphe eindringen und sich neue Nahrungsressourcen erschließen. Es erfolgt eine Septikämie. Das äußere Anzeichen einer solchen Infektion ist ein sofortiger Frassstopp. Der Krankheitsverlauf endet bald mit dem Tod des Zielorganismus. Einen Überblick über alle Teilprozesse gibt Schnepf (1998).

Gemäß Röntgenstrukturanalysen der Cry1Aa- und Cry3A-Toxine kann man drei Domänen unterscheiden (Li 1991; Schnepf 1998). Domäne I wird zur Bildung der Poren benötigt. Sie besitzt amphipathische α -Helices und zeigt Ähnlichkeiten mit kanalbildenden Domänen anderer bakterieller Proteine (Colicin A, Diphtherie-Toxin, *Pseudomonas* Exotoxin). Domäne II enthält β -Faltblattstrukturen und ist an der Rezeptorbindung beteiligt. Hier bestehen Sequenzähnlichkeiten zu den Antigenbindungsstellen der Immunglobuline. Domäne III besitzt ebenfalls β -Faltblattstrukturen und spielt eine Rolle bei der Rezeptorbindung, der Membranpenetration und der Kanalbildung. Einen Überblick gibt Schnepf (1998).

Neben den Cry-Protoxinen können die Kristalle aus weiteren Bestandteilen bestehen: Hierzu zählen u. a. (1) die Cytolysine (Cyt), die verschiedene Zelltypen unspezifisch lysieren können und nicht mit den Cry-Toxinen verwandt sind (Schnepf 1998; Höfte 1989), (2) die endogenen Proteasen (s. Kap. 4.3.2), und (3) DNA, deren Funktion in diesem Zusammenhang noch unklar ist (Schnepf 1998).

Einige BT-Stämme produzieren neben den Kristalltoxinen¹ weitere Toxine, die am Beginn der Infektion meist eine untergeordnete Rolle spielen. Allerdings sind diese erst wenig erforscht. Man unterscheidet dabei β -Exotoxine (Läsionen innerer Organe), Hämolyisin (Lyse von Erythrocyten), Enterotoxine (Läsionen im Darmtrakt) und einige weitere Toxine (Glare 2000; Estruch 1996; Schnepf 1985; Stabb 1994). Manche dieser Stoffe wirken synergistisch mit den Kristalltoxinen (Glare 2000; Manker 1994; Asano 1995). Diese in der Regel löslichen Toxine werden nur während der vegetativen Phase gebildet, haben ein unspezifisches Wirkungsspektrum und können in höheren Konzentrationen auch dem Menschen gefährlich werden, beispielsweise wenn sie in verunreinigter Nahrung vorhanden sind. Eine echte Infektion beim Menschen ist aber nicht bekannt.

1.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung von BT

Unter den Pflanzenschutzmitteln spielen biologische Präparate mit 1 % zwar bislang noch eine untergeordnete Rolle, aus umweltpolitischen Gründen und aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen chemischer Insektizide dürften diese aber in der Zukunft eine immer größere Bedeutung erhalten. Bei 90 % dieser Bio-Insektizide handelt es sich um BT-Präparate, die bereits 1990 mit über 100 verschiedenen Produkten einen weltweiten Umsatz von 110 Mio US-\$ erreichten. Die Hauptanwendungsgebiete liegen derzeit (1) in der Schadraupenbekämpfung durch *B. t. kurstaki* im Anbau von Baumwolle, Tabak, Mais, Obst, (2) in der Stechmückenbekämpfung durch *B. t. israelensis*, u. a. gegen *Anopheles*, den Überträger des Malaria-Erregers *Plasmodium*, (3) und in der Blattkäferbekämpfung durch *B. t. tenebrionis*, z. B. gegen den Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*).

Modifizierte Gene für BT-Toxine, bei denen die Promotoren und der Codongebrauch an die jeweilige Pflanzenart angepasst wurde, konnten in Kulturpflanzen wie Baumwolle, Mais, Kartoffel und Tomate eingebracht werden (Kempken 2000). Hierbei werden bereits die löslichen, aktiven Toxine exprimiert, d. h. die Bildung von Kristallen und Protoxinen wird umgangen. Nach umfangreichen Feldstudien werden diese Pflanzen seit 1996 kommerziell genutzt, v. a. in den USA. Der Anwendungsrückgang herkömmlicher Pflanzenschutzmittel zugunsten transgener Pflanzen hat wirtschaftliche und ökologische Vorteile, da weniger freie Insektizide gekauft und ausgebracht werden müssen und nur Insekten betroffen werden, die von der Pflanze fressen.

Die Anzahl und die Wirkungsspektren identifizierter BT-Stämme nehmen weiterhin dramatisch rasch zu. Nach Schätzungen gab es im Jahre 2000 weltweit 60.000 Isolate, unter denen erst wenige Stämme charakterisiert worden sind und 170 verschiedene Cry-Toxine unterschieden werden konnten (Glare 2000).

¹ Die Kristalltoxine von BT werden häufig auch als δ -Endotoxine bezeichnet. Dieser Begriff sollte jedoch vermieden werden, da er für Mediziner irreführend ist: Normalerweise werden hierbei Lipopolysaccharide verstanden, die beim allergischen Schock eine Rolle spielen.

1.1.3 *Bacillus thuringiensis japonensis*

Mit dem Cry8C-Toxin von *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui (BTJ) konnte Ohba (1992) in Biotests gegen eine Reihe von Scarabaeiden eine toxische Wirkung erzielen, darunter bei den Julikäferarten *Anomala cuprea*, *Anomala rufocuprea* und dem Japankäfer (*Popillia japonica*).

Untersuchungen mit BTJ an den Maikäfern (*Melolontha melolontha* u. *M. hippocastani*), am Junikäfer (*Amphimallon solstitialis*) und am Gartenlaubkäfer (*Phyllopertha horticola*), bei denen sich das Toxin als ineffektiv erwies, wiesen darauf hin, dass die Wirksamkeit auf einige wenige Scarabaeidenarten beschränkt ist (Diplomarbeit Wagner 1999). Bei *M. melolontha* stellte sich heraus, dass das Toxin im Insektendarm rasch proteolytisch abgebaut, und somit vermutlich inaktiviert wird.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen käferspezifischen Toxinen wie Cry3A von *B. t. tenebrionis* (Crickmore 1998) oder Cry18A von *Paenibacillus popilliae* (Zhang 1997) zeigt, dass diese Toxine nicht eng miteinander verwandt sind.

1.2 Der Maikäfer als Schadorganismus

Die Maikäfer (*Melolontha melolontha* und *M. hippocastani*) zählen zur Insektenordnung der Blatthornkäfer (Scarabaeidae), zu denen auch der Junikäfer (*Amphimallon solstitialis*), Julikäferarten (*Anomala spec.*) und der Japankäfer (*Popillia japonica*) gehören. Es sind herbivore Insekten, die sich als Käfer vom Laub und als Larven von den Wurzeln verschiedener Pflanzen ernähren (Harde 1981). Die Entwicklung einer Maikäfer-Generation verläuft holometabol über drei Larvenstadien und dauert je nach Umweltbedingungen drei bis vier Jahre.

Die Notwendigkeit zur Bekämpfung des Maikäfers stößt, wie eigene Erfahrungen zeigen, vielfach auf Unverständnis. Dies hat damit zutun, dass der Maikäfer als Symbol des Glücks gilt und in den meisten Regionen selten anzutreffen ist. Außerdem geraten durch die nachlassende Bedeutung der heimischen Landwirtschaft auch deren Probleme in den Hintergrund. Dies ist anders bei der Stechmückenbekämpfung, deren Kenntnis und Akzeptanz sich durch die unmittelbare Betroffenheit der Bevölkerung erklären lässt. Häufig ist nur in der älteren Bevölkerung und bei direkt Betroffenen in der Land- u. Forstwirtschaft bekannt, dass die Larven (Engerlinge) des Maikäfers und anderer Scarabaeiden durch ihren Wurzelfraß an Kulturpflanzen (in Weinbergen, Obst- und Weihnachtsbaumplantagen, etc.) und in Grünanlagen (Golfplätze etc.) erhebliche wirtschaftliche Schäden anrichten können.

Seit Mitte der Achtziger Jahre nimmt die Maikäferpopulation in Mitteleuropa wieder stark zu. Hauptverbreitungsgebiete sind Regionen in Norditalien, der Schweiz, Frankreich, Dänemark, Polen und Deutschland. Aus diesen betroffenen Ländern treffen sich im Rahmen des EU-Projektes BIPESCO¹ oder des IOBC-Melolontha-Meetings² regelmäßig Vertreter aus Forschung und Landwirtschaft, um Möglichkeiten zur Bekämpfung des Maikäfers voranzutreiben. Es ist das erklärte Ziel, als Ersatz für chemische Insektizide, die z. T.

¹ Biological Pest Control; siehe Kap. 2.7

² International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants: Integrated Control of Soil Pest Subgroup „*Melolontha*“

inzwischen verboten (DDT, Lindan, etc.) oder ökologisch bedenklich sind (Rubitox, etc.), biologische Präparate zu entwickeln, deren Wirksamkeit zu steigern und diese zur Anwendung zu bringen. Hierbei versucht man, die natürlicherweise in Engerlingpopulationen vorkommenden Antagonisten (s. Tab. 1.1) einzusetzen. Welche Kombination von Antagonisten zum Zusammenbruch einer Maikäferpopulation in Anschluss an eine Massenvermehrung führt, ist bis heute unklar. Jedes dieser Pathogene hat den Nachteil, entweder nicht infektiös genug zu sein, zu langsam zu wirken, großtechnisch nicht ausreichend Wirkungserhaltend produziert und formuliert werden zu können, oder zu gefährlich für den Menschen zu sein. Daher ist es notwendig, die Wirkungsmechanismen der Pathogene und Resistenzmechanismen der Zielinsekten zu erforschen, sowie geeignete Verfahren für die Anwendung in der Land- und Forstwirtschaft zu entwickeln.

Tab. 1.1 Zusammenstellung der wichtigsten mikrobiellen Antagonisten von Scarabaeiden (aus Schwenke 1974; Glare 1992; Schnetter 2002; pers. Mitteilung von Dr. W. Schnetter, Universität Heidelberg).

Pathogene von Scarabaeiden	Kurzcharakterisierung
Pilze <i>Beauveria brongniartii</i> * <i>B. bassiana</i> <i>B. amorpha</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> *	roter "Engerlingpilz", enzymatische Penetration der Larven-Kutikula, Durchwucherung der Pilzhyphen im gesamten Körper, mechanische und toxische Gewebeerstörung - - - -
Protozoa <i>Nosema melolonthae</i> * (Mikrosporida)	obligate intrazelluläre Parasiten, horizontale und vertikale Übertragung, Penetration von Zellen durch Abschuss eines Polarfilaments
Viren Baculoviren* Entomopoxviren* Parvoviren* nicht charakterisierte Viren*	Befall des Fettkörpers Befall des Fettkörpers und der Hämocyten - verursachen „Wassersucht“
Rickettsien <i>Rickettsiella popilliae</i> *	obligates Pathogen, Befall des Fettkörpers und der Hämocyten, intrazelluläre Vermehrung, verursacht „Lorscher Krankheit“, evtl. Säugetier-gefährlich
Bakterien <i>Xenorhabdus</i> <i>Pseudomonas</i> * <i>Serratia</i> <i>Clostridium</i> <i>Bacillus cereus</i> * <i>Bacillus thuringiensis</i> (Paeni-) <i>Bacillus popilliae</i> *	potentielles Pathogen, Nematoden-Symbiont, der durch <i>Steinernema</i> in das Hämocoel geschleust wird fakultatives Pathogen, Invasion in das Hämocoel fakultatives Pathogen, verursacht „Amber Disease“ in <i>Costelytra zealandica</i> , Abbau der Chitinwand des Vorderdarms, Invasion in das Hämocoel, Septikämie - Bildung diverser insektizider Toxine und Enzyme s. Kap. 1.1 obligates Pathogen, Penetration des Mitteldarmepithels und Vermehrung im Hämocoel, verursacht „Milky Disease“
Nematoden Steinernema-Arten Heterorhabditis-Arten	Eindringen durch larvale Körperöffnungen und Einschleusung des bakteriellen Pathogens <i>Xenorhabdus</i> aktive Penetration durch die Larven-Kutikula und Einschleusung des bakteriellen Pathogens <i>Photorhabdus</i>

Die mit * gekennzeichneten Pathogenen wurden auch aus *M. melolontha* isoliert, bzw. zeigten dort in Biotests Infektiosität.

Die derzeitigen wissenschaftlichen Arbeiten konzentrieren sich auf die Erforschung entomopathogener Nematoden wie *Steinernema glaseri* und *Heterorhabditis bacteriophora* (Bernier 2001; Koppenhöfer 1997) und des Engerlingpilzes *Beauveria brongniartii* (G. Zimmermann, Biologische Bundesanstalt Darmstadt; BIPESCO), sowie des Fertilitätshemmers Neem, der aus dem indischen Neem-Baum gewonnen wird (Schnetter 1996). Diese Substanz wird mittlerweile im Rahmen einer Hubschrauberbekämpfung durch die Landesanstalt für Pflanzenschutz des Landes Baden-Württemberg im Freiland getestet. Des Weiteren werden bakterielle Insektizide untersucht (Zhang 1997; Wagner 1999; Schnetter 2002; die vorliegende Arbeit). Ein Einsatz eines selektiv wirkenden Bakterienpräparates ist jedoch noch nicht möglich, da die Wirksamkeit der bisher bekannten *Bacillus*-Toxine ungenügend ist.

1.3 Ziele der Promotion

Bei der Untersuchung der Wirkungsweise käferspezifischer bakterieller Toxine wurde in den bisherigen Veröffentlichungen der Schwerpunkt auf wirksame Toxinvarianten gelegt und die Aufklärung der Abwehrstrategien unempfindlicher Insektenarten vernachlässigt. Die Abwehrmechanismen sind aber gerade bei den im Boden lebenden Larven der Maikäfer von entscheidender Bedeutung und müssen eingehender aufgeklärt werden.

Speziell bei den Cry8C-sensitiven Scarabaeiden-Arten wurden bisher nur die für die Aktivierung notwendigen Proteasen beschrieben, die das Protoxin durch Spaltung zum biologisch aktiven Toxin überführen. Spezifische Aktivitätsuntersuchungen, die die Rolle aller Proteasen im Darmsystem untersuchen, fehlen. Gerade aber hier sollte man ansetzen, um die Ursache für eine mögliche Inaktivierung des Toxins zu untersuchen.

Hinzu kommen ungeklärte Prozesse, die mit den physiologischen Bedingungen des Mitteldarms des Maikäfers in Zusammenhang stehen. Hierbei ist bislang unklar, wie die Kristalle gelöst werden, und welche Faktoren den proteolytischen Abbau des Toxins beeinflussen.

Ziel ist es dabei auch, die auftretenden Spaltprodukte des Toxins zu charakterisieren, und insbesondere deren Toxizität zu ermitteln. Hieraus kann abgeleitet werden, bei welchem Schritt die Inaktivierung des Toxins erfolgt.

Durch einen Vergleich der Ergebnisse bei *M. melolontha* mit einem BTJ-sensitiven Scarabaeiden, hier *P. japonica*, können Unterschiede herausgearbeitet werden und die Faktoren identifiziert werden, die eine Toxizität von Cry8C ermöglichen bzw. verhindern.

Nach der Identifizierung dieser Resistenzmechanismen muss diskutiert werden, welche Bedeutung die Ergebnisse bei *M. melolontha* für das Verständnis des Wirkungsmechanismus anderer BT-Toxine haben.

2 Material und Methoden

2.1 Bereitstellung des Toxins

2.1.1 *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui

Bacillus thuringiensis japonensis Stamm Buibui (BTJ) wurde von J. S. Feitelson, Molecular Biology, Mycogen Corporation zu Untersuchungen an Maikäfern zur Verfügung gestellt. Dieses saprophytische Bodenbakterium (Serotyp 23) wurde durch Ohba (1992) isoliert und wirkt als Scarabaeiden-spezifisches Insektizid bei Engerlingen von *Popillia japonica* und *Anomala*-Arten. BTJ bildet bei der Sporulation sphärisch-ovoide parasporale Proteinkristalle, die das Cry8Ca1-Protoxin enthalten. Dieses hat eine Masse von 130424 Da und besteht aus 1160 Aminosäuren. Die Sequenzdaten sind einsehbar bei der EMBL-Datenbank unter dem Eintrag U04366.

2.1.2 Anzucht der Bakterien und Isolation der Kristalle

Die Bakterienzucht mit Flüssigkulturen wurde wie bei Faloci (1990) durchgeführt. Die nach Autolyse freiwerdenden Sporen, Kristalle und Zelltrümmer wurden drei Waschzentrifugationen mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM CaCl₂ (A-Puffer) bei 8 000 g und 4°C für je 20 min unterzogen. Anschließend wurde eine zehnmünütige Ultraschall-Pulsbehandlung sowie eine NaBr-Dichtegradientenzentrifugation (Kap. 2.1.3) durchgeführt.

2.1.3 NaBr-Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung der Toxinkristalle

Während einer Zentrifugationsdauer von 15 h wurden die Bestandteile der aufgetragenen Probe in einem kontinuierlichen 34-56 %igen (w/v) Dichtegradienten bei 80 000 g und 4°C aufgetrennt. Sporen und Zelltrümmer blieben dabei auf der Oberfläche liegen, während Kristall-Akkumulationen inmitten des Gradienten wiederzufinden waren und mit einer Pasteurpipette abgenommen werden konnten. Durch mikroskopische Kontrollen (1000-fach, Ölimmersionsobjektiv, Phasenkontrastmikroskop) wurde entschieden, ob die Reinheit der Kristalle durch weitere Läufe verbessert werden mußte. Die isolierten Kristalle wurden nun drei weiteren Waschschritten mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM CaCl₂ unterzogen, im selben Puffer als Kristallsuspension aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.1.4 Lösen und Reinigen des Toxins

Die Kristalle wurden (leicht verändert nach Hori 1994) bei chaotropen-reduzierenden Bedingungen (5 % Kristalle in 250 mM DTT, 250 mM Na₂CO₃ pH 8,0) bei Raumtemperatur unter starkem Rühren während 90 min gelöst. Durch die Aktivität begleitender endogener Proteasen wird dabei das 130 kDa Protoxin zu einem 65 kDa Toxin prozessiert. Nach einer Zentrifugation (15 000 g, 5 min) wurde der Überstand mit einem Vivaspin-Konzentrator

(Vivascience, Ausschlußgröße: 5 kDa) ca. 10-fach konzentriert und gegen 50 mM Tris/HCl pH 8,0 (A*-Puffer) für 16 h bei 4°C zur Entfernung von DTT und Na₂CO₃ dialysiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 000 g, 5 min) wurde der Überstand als Probe für die nun folgende DMAE-Anionenaustauschchromatographie eingesetzt, die wie bei Hori (1994) durchgeführt wurde. In Kürze: Die Auftrennung wurde mit einer Flußrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Als Startpuffer diente A*-Puffer. Die Elution erfolgte mit einem kontinuierlichen Salzgradienten von 0 bis 1 M NaCl. Die Peakfraktionen wurden gepoolt, gegen A*-Puffer dialysiert, konzentriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Proben wurden dann bei proteolytischen Versuchen (2.5.1) oder in Biotests (Kap. 2.2.2) eingesetzt.

2.1.5 Endogene Proteasen

Die endogenen Proteasen von BTJ wurden nach der Methode von Reddy (1997) isoliert. Die Proben wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Diese wurden entweder mittels photometrischer Aktivitätstests (Kap. 2.3.2), Aktivitätsblots (Kap. 2.3.4) und Zymogrammen (Kap. 2.3.5) biochemisch charakterisiert oder in proteolytischen Versuchen mit Cry8C (Kap. 2.5.1) eingesetzt.

2.2 Vom Tiermaterial bis zum Reinigen der Proteasen

2.2.1 Insektenkultur

Herkunft der Arten und Sammeln

Die Fundorte von Scarabaeiden (Tab. 2.1) werden v. a. durch den Wurzelfraß der Engerlinge und den damit verbundenen Schäden in der Land- und Forstwirtschaft bekannt. Für Hinweise danke ich Herrn M. Fröschle (Landesanstalt für Pflanzenschutz Baden-Württemberg) und Herrn Dr. C. Schlegel (Pflanzenschutzamt Bruchsal), sowie Herrn Dr. W. Schnetter (Zoologisches Institut Universität Heidelberg).

Die Engerlinge wurden mit dem Spaten ausgegraben und einzeln in mit Erde gefüllten Gefäßen (Ø 4,5 cm · 8 cm) in den hierfür günstigen Sommermonaten gesammelt, wenn diese direkt unter der Grasnarbe an den Wurzeln anzutreffen sind.

Die Käfer wurden zu Beginn der Flugsaison gesammelt, einem Zeitpunkt, bei dem die Lebenserwartung der Tiere noch sehr hoch liegt. Die Tiermaterialbeschaffung erwies sich an Waldrändern mit Laubbäumen (v. a. Eiche, Rotbuche) in den kühlen Morgenstunden am günstigsten, wenn die Flugaktivität noch sehr gering ist.

Tab. 2.1 Herkunftsort und Entwicklungsstadium der gesammelten Arten

Art	Entwicklungsstadium	Herkunftsort
Feldmaikäfer (<i>M. melolontha</i>)	L1-L3, K	Obergrombach (Bruchsal)
	L2, L3, K	Dielheim-Horrenberg (Kraichgau)
	L1-L3, K	Kaiserstuhl ¹
	L3	Niederbeerbach (Darmstadt)
	L3	Mecklenburg-Vorpommern ²
Waldmaikäfer (<i>M. hippocastani</i>)	L1-L3, K	St. Leon-Rot
Junikäfer (<i>Amphimallon spec.</i>)	L2	Brühl (Nordbaden)
	K	Wiesloch
Japankäfer (<i>P. japonica</i>)	L1-L3	Terceira/Azoren ¹

Abk.: L1-L3: Larvenstadien, K: Käfer

Haltungsbedingungen

Die Käfer wurden aufgrund des kurzen Auftretens in der Natur unmittelbar nach dem Sammeln im Freiland für die Darmsaft-Charakterisierung (Kap. 2.3, 2.4) eingesetzt. Aufgrund der hohen Sterblichkeitsrate wurde auf eine mittel- bis längerfristige ständige Bereitstellung im Labor verzichtet.

Die Haltung der Engerlinge erfolgte in den Wintermonaten bei 4°C, sonst bei 15°C in Kühlräumen im Dunkeln. Jedes Tier wurde dabei einzeln in zur Hälfte mit Erde gefüllten Plastikgefäßen (8·4,5 cm) aufbewahrt und mit Möhrenscheiben (*Daucus carota*) gefüttert. Regelmäßige Kontrollen wurden durchgeführt, um den Feuchtigkeitsgehalt der Erde konstant zu halten und um kranke oder tote Tiere auszusondern. Länger als 6 Monate eingelagerte Larven wurden nicht mehr verwendet.

2.2.2 Biotests

Vor der Durchführung von Biotests wurden die eingelagerten Engerlinge einigen Tage an Raumtemperatur gewöhnt. Im Unterschied zur normalen Haltung (Kap. 2.2.1) wurden die Kontrollen intensiviert, indem die Tiere nun dreimal pro Woche gesichtet und gefüttert wurden, und die Befunde dokumentiert wurden.

Die Applikation der zu testenden Proben erfolgte durch eine Injektion mit einer Kanüle durch die Mundöffnung direkt in den Mitteldarm. Um eine Verletzung der Darmwand zu minimieren, wurden die Kanülenspitzen vor der Behandlung stumpf gefeilt. Bei Drittlarven von *M. melolontha* wurden Kanülen mit 0,7 mm Durchmesser eingesetzt, bei den kleineren Zweitlarven von *P. japonica* Kanülen mit einem Durchmesser von 0,4 mm. Sterbende Tiere, die sich innerhalb einer Stunde verfärbten, was auf das Durchstoßen der Darmwand und die Vermischung des Darmsafts mit der Hämolymphe während der Applikation hindeutet, fanden keinen Eingang in die Biotests. Darüber hinaus wurden zur Beurteilung längerfristiger Schäden durch die Injektionsmethode Kontrolltiere eingesetzt.

¹ z. T. durch Friedericke Maass (Landesanstalt für Pflanzenschutz Baden-Württemberg) gesammelt

² durch Frau Rehm (Landesanstalt für Pflanzenschutz Mecklenburg-Vorpommern) gesammelt

¹ durch Herrn Dr. D. Lopes (Universität der Azoren) gesammelt

Materialien:

- Kanülen: Sterican, Nr. 465762/4, 0,7-30 mm; Neoject, Nr. EU20, 0,4-19 mm
- Spritze: Becton Dickinson, Plastipak, Nr. 970955, 1 ml, 10 µl-Skalierung

2.2.3 Statistik

Zur Beurteilung, ob unterschiedliche Ergebnisse beim Vergleich verschiedener Biotestansätze signifikant voneinander abwichen, wurden mit dem χ^2 -Vier-Felder-Test und dem Fischer-Test zwei Methoden aus dem Bereich der schließenden Statistik gewählt. War dies der Fall, konnte dies mit einer definierten Irrtumswahrscheinlichkeit auf die toxische Wirkung bestimmter Proben zurückgeführt werden.

 χ^2 -Vier-Felder-Test

Dieser Test wurde in den Fällen angewendet, bei denen die vorgeschriebenen, bei Engel (1997) nachlesbaren Kriterien (mind. 30 Tiere/Ansatz, Höhe der Erwartungswerte, etc.) erfüllt waren. Hierzu wurden die beobachteten Werte (Tab. 2.1) gemäß der untenstehenden Formel zu einer Prüfgröße χ^2 verrechnet und nach Festlegung eines Signifikanzniveaus mit Tabellenwerten verglichen.

Tab. 2.1 r · k –Konvergenztafel; hier: 4-Felder-Tafel

	Tote Tiere	Lebende Tiere	Summe
Ansatz	A	B	A+B
Kontrolle	C	D	C+D
Summe	A+C	B+D	N=A+B+C+D

Die Prüfgröße wurde aus den beobachteten Werten (obs) und den Erwartungswerten (exp) nach der folgenden Formel berechnet, die den von Yates eingeführte Korrekturfaktor enthält.

$$\chi^2 = \sum \frac{(|obs - exp| - 0,5)^2}{exp}$$

Die in der vorliegenden Arbeit ausgewerteten Ergebnisse wurden bei einer $\alpha = 5$ %-igen Irrtumswahrscheinlichkeit und dem für eine 4-Felder-Tafel geltenden Freiheitsgrad 1 auf Signifikanz überprüft. Der Tabellenwert für dieses Niveau lautet 3,84. Lag die Prüfgröße χ^2 darüber, bedeutete dies, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen bestand. Diese Methode wurde bei den *M. melolontha*-Biotests mit mindestens 30 Tieren pro Ansatz angewendet.

Fischer-Test

Dieser Test wurde bei den Biotests mit *P. japonica* eingesetzt, bei denen es nur kleine Stichprobenumfänge ($n < 30$) gab, und somit die Kriterien zur Anwendung des χ^2 -Vier-Felder-Tests nicht erfüllt waren.

Legte man eine $r \cdot k$ -Kontingenztafel zugrunde (Tab. 2.1), so berechnete sich die Wahrscheinlichkeit für die gegebene Anordnung nach der Formel

$$P_i = \frac{(A+B)!(C+D)!(A+C)!(B+D)!}{N!A!B!C!D!}$$

Zur Berechnung der Prüfgröße und aller notwendigen Details sei auf Engel (1997) verwiesen. Auch hier wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ für die Beurteilung signifikanter Unterschiede zugrunde gelegt.

2.2.4 Präparation des Darmsafts

Der Engerling wurde unter Leitungswasser grob gesäubert und für mindestens zehn Minuten auf Eis ruhiggestellt. Um eine nachfolgende Durchmischung des Darmsafts mit der Hämolymphe zu verhindern, wurde diese zum größten Teil über Öffnungen, die durch Abschneiden der Beine geschaffen wurden, vorsichtig aus der Larve gepresst. Danach wurde die Kopfkapsel mit einer Nagelschere entfernt, wodurch der anteriore Mitteldarmabschnitt direkt zugänglich wurde. Restliche Hämolymphe in diesem Bereich wurde mit absorbierendem Papier aufgesaugt. Der Inhalt des Mitteldarms wurde nun nach Durchstechen des Darmepithels mit einer Pipette aufgenommen und bei 4°C und $150\,000\text{ g}$ zwei Stunden zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Der Überstand, fortan als Darmsaft bezeichnet, wurde aliquotiert und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert. Verdünnungen wurden, falls nicht näher definiert, mit destilliertem Wasser durchgeführt.

2.2.5 Präparation der Darmabschnitte

Die ersten Schritte der Präparation erfolgten analog zu denen der Darmsaft-Isolation (Kap. 2.2.4). Nach Entfernen der Kopfkapsel wurde dann jedoch wie folgt vorgegangen:

Mit einer feinen Nagelschere wurde die Kutikula ventral vom anterioren Ende her bis zur Afterspalte aufgeschnitten, ohne den unmittelbar angrenzenden Darmtrakt zu perforieren. Um das Körperinnere freizulegen wurde die Kutikula ausgebreitet und mit Stecknadeln in einer Präparierschale fixiert. Störende Hämolymphe, Fettkörper und Tracheen wurden sodann entfernt. Die weitere Vorgehensweise richtete sich danach, ob Membranvesikel (BBMV; Kap. 2.2.6) isoliert werden sollten, oder Redoxpotentialmessungen (Kap. 2.4.2) bzw. pH-Messungen (Kap. 2.4.1) in situ durchgeführt werden sollten.

2.2.6 Präparation von „Brush border membrane vesicles“ (BBMV)

Im Anschluss an die Präparation der Darmabschnitte (Kap. 2.2.5) wurden die weiteren Schritte unter Mannitolpuffer (s. u.) durchgeführt. Zunächst wurde das Mitteldarmrohr, das sich morphologisch deutlich von den anderen Abschnitten abgrenzen lässt, mit einer Schere herausgetrennt und mit einem Längsschnitt geöffnet, damit der Darminhalt entfernt werden konnte. Das Darmepithel wurde sodann mit neuem Puffer gespült und bei -20°C gelagert, bevor mit den weiteren BBMV-Präparationsschritten (siehe Wolfersberger 1987) fortgefahren werden konnte, die eine Anzahl von insgesamt 20-30 Darmepithelien als Ausgangsmaterial erforderten. Die fertig präparierten BBMV wurden aliquotiert und bei -70°C gelagert. Diese dienten als Proben für biochemische Protease-Analysen (Kap. 2.3).

Verwendete Puffer:

- Mannitolpuffer: 17 mM Tris/HCl pH 7,5, 300 mM Mannitol, 5 mM EGTA, 1 mM DTT
- HEPES-Puffer: 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA
- MgCl_2 -Puffer : 50 mM MgCl_2 in dH_2O

2.2.7 Freisetzung der BBMV-Aktivitäten

Die Freisetzung der membranständigen BBMV-Aminopeptidasen wurde mit den Detergenzien Triton X-100, Octylglucopyranoside, CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-Propansulfonat) und Natriumdesoxycholat, sowie mit der GPI-Anker-spaltenden Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) [E.C. 3.1.4.10] in Anlehnung an Hooper (1987) getestet. Als Positivkontrolle der Enzymaktivität wurde die Freisetzung der GPI-verankerten alkalischen Phosphatase [EC 3.1.3.1] aus einer Schweineniere (*Sus scrofa*) getestet.

- Inkubation mit den Detergenzien: BBMV-Pellets wurden mit je 1 Vol. detergenshaltigem A-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM CaCl_2) zuzüglich 6 mM Triton X-100, 9 mM Natriumdesoxycholat, 6 mM Octylglucopyranoside, oder 20 mM CHAPS für 90 min bei 25°C geschüttelt. Im Anschluss an eine 90-minütige Zentrifugation bei 31000 g wurden die Pellets in je 1 Vol. A-Puffer resuspendiert und photometrischen Tests auf Aminopeptidase-Aktivität unterzogen (Kap. 2.3.2).
- Inkubation mit PI-PLC: BBMV-Pellets wurden mit je 1 Vol. A-Puffer zuzüglich 0,1 u PI-PLC/mg Protein für 2 h bei 37°C geschüttelt. Im Anschluss an eine 90-minütige Zentrifugation bei 31000 g wurden die Pellets in je 1 Vol. A-Puffer resuspendiert und photometrischen Tests auf Aminopeptidase-Aktivität unterzogen (Kap. 2.3.2).
- 1 g einer gekauften Schweineniere wurde in A-Puffer homogenisiert und durch mehrmalige Zentrifugationen (15000g, 10 min) und Resuspensionen mit A-Puffer gewaschen. Die Probe wurde einer Inkubation mit PI-PLC unterzogen und die freigesetzte Phosphatase-Aktivität durch einen PNPP-Test bestimmt.
- PNPP-Test: 10 μl Probe wurde mit 490 μl PNPP-Lösung (1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in 1 M Ethanolamin pH 9,5) gemischt. Die Enzymaktivität wurde dann aus der Extinktionsänderung/Zeit bei 405 nm über das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmt.

2.2.8 Säulenchromatographien: Vorgehensweise bei der HPLC-Anlage

Zur Reinigung des 65 kDa Toxinfragments von BTJ (Kap. 2.1.4) und der Darmsaft-Proteasen von *M. melonantha* wurden Anionenaustauschchromatographien durchgeführt (Kap. 2.2.9b). Zur Isolierung des Maikäfer-Astacins erfolgte zudem eine Affinitätschromatographie (Kap. 2.2.9c). Um die an den genannten Stellen beschriebenen Aufreinigungsprotokolle übersichtlich zu halten, werden die notwendigen technischen Informationen für die Chromatographie an sich an dieser Stelle gesondert aufgeführt.

Um konstante, reproduzierbare Bedingungen zu garantieren, wurden die Säulenchromatographien mit einer HPLC-Anlage durchgeführt, die dankenswerterweise von Dr. Ralf Bischoff vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) zur Verfügung gestellt worden war. Diese Anlage wurde – abgesehen vom HPLC-Controller und dem Schreiber - in einem umgebauten Kühltank bei 4°C betrieben.

Es folgen einige Anmerkungen zur Vorgehensweise und zu spezifischen Geräteeinstellungen:

- Alle Säulen wurden eigenhändig mit Säulenmaterial gefüllt. Ein Einschluss von Luft während des Befüllens, aber auch im gesamten HPLC-System während der Läufe musste vermieden werden. Hierfür wurden zudem alle verwendeten Puffer zuvor mit einer Vakuumpumpe unter leichtem Rühren entgast.
- Die Behandlung der Säulenmaterialien (max. Flussrate, pH-Bereich, Regeneration, etc.) erfolgte streng nach den Vorschriften der Hersteller.
- Die Hinterspülung des HPLC-Systems, bestehend aus dH₂O, wurde vor jedem Lauf erneuert. Bestimmte Standardeinstellungen des Systems sind Tab. 2.1 zu entnehmen.
- Die Säulenmaterialien wurden bei einer Erstbenutzung oder nach Folgebenuztung bzw. Regeneration solange mit dem Startpuffer/Auftragspuffer gespült, bis der Schreiber eine konstante Grundlinie erreicht hatte, mindestens jedoch 1 h. Gleiches galt für die Durchläufe.

Tab. 2.1 Standardeinstellungen des HPLC-Systems

Gerät	Einstellung
HPLC-Controller	Flow rate: 0,5 ml/min
HPLC-Pumpe	Flow rate: 0,5 ml/min
UV-Meter	280 nm
Schreiber	2 bzw. 3 mm/min; 0,1 UV; 2 Gradient
Fraktionssammler	1 Fraktion/min

Verwendete Geräte und Materialien:

- HPLC Controller: LKB Bromma, Nr. 2152 LC
- HPLC Pumpe: LKB Bromma, Nr. 2248
- Gradientenmischventil: LKB Bromma
- Luftfallenmischer: LKB Bromma, Nr. 11300 Ultrograd Mixer Driver
- Probenauftragsventil: Rheodyne, Nr. 7125, Syringe Loading Sample Injector
- Spritze: B. Braun Melsungen AG, 10 ml
- Kanüle: Besta-Technik Kat.-Nr. 7-7215

- Allg. Zubehör wie Adaptoren: Besta-Technik
- UV-Meter: Kratos, Spectroflow 757 Absorbance Detector, Messung bei 280 nm
- Fraktionssammler: Foxy Jr., ISCO
- Schreiber: Amersham Pharmacia Biotech, REC 112
- Kühlschrank: Liebherr, profi line
- Vakuumpumpe: Vacuubrand GmbH, Wertheim, Typ MZ 2C

2.2.9 Reinigung der Darmsaft-Proteasen

a) Ammoniumsulfat-Fällung von Darmsaft-Proteinen

Der Darmsaft wurde mit dH₂O 1:10 verdünnt und mit definierten Ammoniumsulfatkonzentrationen jeweils 4 h bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer sukzessiv gefällt. Nach Zentrifugation (15 000 g, 5 min) wurde der Überstand einem neuen Zyklus unterzogen. Die Pellets wurden in 1/10 Vol. A-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM CaCl₂) aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 000 g, 5 min) wurden die Überstände mittels Zymogrammen (Kap. 2.3.5) analysiert. Überstände mit den gewünschten Protease-Aktivitäten wurden gepoolt, bei 4°C 16 h gegen A-Puffer dialysiert (Kap. 2.6.1) und als Ausgangsmaterial für die Anionenaustausch-Chromatographie eingesetzt.

b) DMAE-Anionenaustauschchromatographie der Darmsaft-Proteasen

Die durch die Ammoniumsulfat-Fällung bereitgestellten Darmsaft-Proteasen wurden durch eine Säulenchromatographie mit dem Anionenaustauscher Fractogel EMD DMAE (s. u.) fraktioniert (siehe auch Kap. 2.2.8). Diese wurde mit einer Flußrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Als Startpuffer diente in zwei Fällen (Kap. 3.6.1, Lauf 1 und 3) 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM CaCl₂ (A-Puffer). Zwei alternative Chromatographien erfolgten im gleichen Puffer bei verschiedenen pH-Werten, nämlich 6,0 (Lauf 2) und 8,5 (Lauf 4). In diesen Fällen mussten auch die Proben zuvor gegen den entsprechenden Puffer dialysiert werden. Die Elution erfolgte in allen Fällen mit einem kontinuierlichen Salzgradienten von 0 bis 2 M NaCl.

Die Einzelfractionen (je 500 µl) wurden mittels Zymogrammen (Kap. 2.3.5) auf das Vorkommen proteolytischer Aktivität untersucht. Entsprechende Fractionen wurden direkt bei proteolytischen Versuchen mit Cry8C eingesetzt (Kap. 2.5.1), oder für die anschließende Affinitätschromatographie zur Aufreinigung des Maikäfer-Astacins (Kap. 2.2.9c) gepoolt und gegen den dort verwendeten Startpuffer dialysiert. In beiden Fällen wurden Aliquots angefertigt und bis zur Durchführung des nächsten Arbeitsschritts bei -20°C gelagert.

Regeneration des DMAE Säulenmaterials

Zum Ablösen von Probenbestandteilen wie den braunen Farbstoffen des Darmsafts, die sich noch nach Salz- oder pH-Elutionen am Säulenmaterial befanden, wurde der Anionenaustauscher gemäß Herstellerprotokoll 30 min mit 0,5 M NaOH gespült und anschließend mit dem Startpuffer der nächsten Chromatographie für mindestens 1 h equilibriert.

Spezifische Einstellungen, Materialien und Puffer:

- HR5/10 column (Pharmacia Nr. 18-0384-01), von Ralf Bischof (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt, Säulenmaterial-Volumen: 2 cm · Ø 0,5 cm
- Anionenaustauscher: Böhlinger, Fractogel EMD DMAE-650(M), Korngröße 0,04 - 0,09 mm
- Flussrate: 0,5 ml/min; 60 sec./Fraktion; kein Vorlegepuffer
- Schreibereinstellungen: 100 mV, 3 mm/min
- UV-Meter: 0,64 oder 1,28 AbsUnits
- Startpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0 (bzw. 6,0 oder 8,5), 5 mM CaCl₂

c) Affinitätschromatographie mit PLG-Hydroxamat

Zur Aufreinigung der astacinartigen Darmsaftprotease des Maikäfers wurde eine von Frank Möhrlen (Zoologie Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellte, mit einer Affinitätsmatrix zur Aufreinigung von Astacinen gefüllte Säule verwandt. Dabei handelte es sich um den reversiblen Astacin- und Elastasen-Inhibitor PLG-Hydroxamat, der über einen Spacer an CH-Sepharose 6B gekoppelt worden war. Als Startpuffer wurde A*-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0) gewählt. Als Probe diente der in Lauf 4 (Kap. 2.2.9b) bereitgestellte Durchlauf, der gegen A*-Puffer dialysiert worden war. Die Elution erfolgte durch eine sprunghafte Erhöhung des pH-Werts mit 50 mM Tris/HCl pH 11,0. Um die aufgefangenen Fraktionen (500 µl) zu neutralisieren, wurde 215 µl 500 mM Tris/HCl pH 8,0 pro Fraktion vorgelegt. Aufgrund einer anschließenden Zymogramm-Analyse (Kap. 2.3.5) bzw. einer fluorometrischen Dns-PKFAPWV-Analyse (Kap. 2.3.3) wurde entschieden, welche Fraktionen für die anschließende Konzentrierung (in Kap. 2.1.4 angesprochen) und die präparativen Gele (Kap. 2.5.2) gepoolt wurden.

Spezifische Einstellungen, Materialien und Puffer:

- eine von Frank Möhrlen (Zoologie Heidelberg) dankenswerterweise zur Verfügung gestellte Säule, Säulenmaterial-Dimensionen: 5 cm · Ø 1 cm
- Affinitätsmatrix: CH-Sepharose 6B mit PLG-Hydroxamat als Ligand
- Flussrate: 0,5 ml/min; 60 sec./Fraktion; Vorlegepuffer: 500 mM Tris/HCl pH 8,0
- Schreibereinstellungen: 100 mV, 2 mm/min
- UV-Meter: 0,1 AbsUnits
- Startpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0

2.3 Analyse von Proteasen

2.3.1 Substrate und Inhibitoren

Tab. 2.1 gibt einen Überblick über die eingesetzten künstlichen Farbsubstrate und spezifischen Inhibitoren zur biochemischen Charakterisierung verschiedener Klassen und Typen von Proteasen und deren Abkürzungen.

Tab. 2.1 In dieser Arbeit verwendete chromogene bzw. fluorogene Substrate und spezifische Inhibitoren verschiedener Klassen bzw. Typen von Proteasen.

Protease-Typ	Chromogene/fluorogene Substrate	Spezifische Inhibitoren
Trypsinartige Serinproteasen	BAPNA (N-Benzoyl-L-Arg p-Nitroanilid)	SBTI (Trypsin-Inhibitor der Sojabohne), TLCK (N-p-Tosyl-L-Lys Chloromethylketon), PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)
Chymotrypsinartige Serinproteasen	AcFpNA (N-Acetyl-DL-Phe-p-Nitroanilid)	TPCK (N-Tosyl-L-Phe Chloromethylketone), PMSF
Elastaseartige Serinproteasen	SAAPpNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro p-Nitroanilid), SAAPLpNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu p-Nitroanilid), STANA (Succinyl-tri-Ala p-Nitroanilid)	Elastatinal, PMSF, SBTI
Cysteinproteasen	-	E-64 (Trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido(4-Guanidinio)-Butan)
Aspartatproteasen	-	Pepstatin A
Metalloproteasen allgemein	-	Phosphoramidon, 1,10-Phenanthrolin
Astacinartige Metalloproteasen	Dns-PKFAPWV (Dansyl-Pro-Lys-Phe-Ala-Pro-Trp-Val)	PLG-NHOH (Pro-Leu-Gly Hydroxamat), 1,10-Phenanthrolin
Aminopeptidasen	LpNA (Leu p-Nitroanilid)	Bestatin
Carboxypeptidasen	N-CBZ-Phe-Ala (N-Carbobenzyloxy-Phe-Ala), Hip-Phe (Hippuryl-Phe), Hip-Arg (Hippuryl-Arg)	-
(metallische Cofaktoren)	-	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), EGTA (Ethylen-bis(oxyethylennitrilo)tetraessigsäure)

2.3.2 Photometrische/Fluorometrische Aktivitätstests

Die synthetischen Protease-Farbsubstrate wurden gemäß der Herstelleranleitungen gelöst. Die p-Nitroanilid (pNA) –Substrate (Abb. 2.1) wurden in einer Endkonzentration von 0,2 mM in 20 mM Tricin pH 8,0 eingesetzt. STANA, N-CBZ-Phe-Ala, Hip-Arg und Hip-Phe wurden zu je 0,5 mM in 0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl getestet. In einer typischen Messung wurden 10 µl Testsubstanz, z. B. 1:10 verdünnter Darmsaft, mit 480 µl Substratlösung zuzüglich 10 µl Inhibitorlösung bzw. dH₂O gemischt und mittels Photometer/Fluorometer die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit bestimmt. pNA-Substratreaktionen wurden bei 405 nm, N-CBZ-Phe-Ala bei 230 nm, Hip-Arg bei 254 nm, und Hip-Phe bei 278 nm gemessen. Die Umrechnung der Extinktionswerte in Konzentrationen im Falle von Nitroanilin erfolgte durch das Lambert-Beer'sche Gesetz mit $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 10\,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

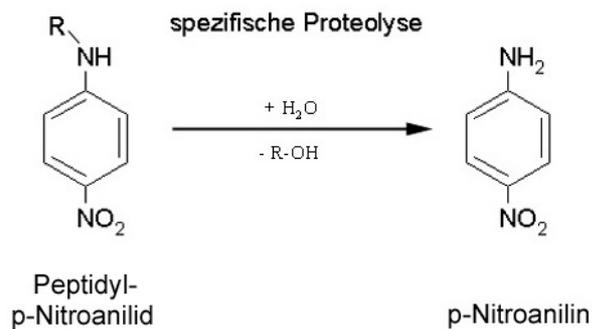


Abb. 2.1 Spezifische Substratreaktion von Peptidyl-p-Nitroaniliden wie BApNA, SAAP(L)pNA, STANA oder LpNA (Erklärung der Abk. siehe Kap. 2.3.1) zu Oligopeptiden und dem Chromogen Nitroanilin. Die Spezifität der proteolytischen Spaltung hängt von der P1-Position des Substrats ab, d. h. derjenigen Aminosäure, die die Peptidbindung zum Nitroanilid bildet.

Die Messergebnisse wurden mit einer Maßzahl der beschreibenden Statistik, der Standardabweichung, angegeben. Sie ist ein Maß für die Streuung der Einzelwerte um einen arithmetischen Mittelwert. In dieser Arbeit wurden die Mittelwerte von jeweils drei parallelen Versuchen \pm Standardabweichungen dargestellt.

2.3.3 Messungen mit einem dansylierten Oligopeptid-Substrat

Das dansylierte Oligopeptid-Substrat Dns-PKFAPWV wurde von INTERACTIVA (Ulm) synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt. Die Spaltung der zentralen Phe-Ala-Peptidbindung verursacht im Vergleich zum intakten Substrat einen mindestens 10-fachen Anstieg der Tryptophan-Fluoreszenz bei 340 nm. Die Substratkonzentration wurde basierend auf der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz mit $\epsilon_{340\text{nm}} = 4300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. Die Messungen wurden in einem Volumen von 300 μl mit 16,67 $\mu\text{g/ml}$ Substrat, 50 mM Tris/HCl pH 8,0 in 0,5 ml Quarzküvetten an einem Perkin-Elmer LS50 Spectrofluorometer für 10 min bei 25°C durchgeführt, wobei bei einem typischen Ansatz 2 μl 1:200 verdünnter Darmsaft gemessen wurde.

2.3.4 Aktivitätsblots

Proteasen, die zur Spaltung von pNA-Substraten in der Lage sind, wurden in modifizierten Western Blots nach Oppert (1996) charakterisiert.

Die Proben wurden mit einem 5-fach konz. nichtreduzierenden Probenpuffer (0,4 M Tris/HCl pH 6,8, 5 % SDS, 20 % Glycerol, 0,03 % Bromphenolblau) gemäß Sterchi (1999) für 10 min inkubiert. Zum Erhalt der Aktivitäten wurde auf eine Hitzedenaturierung verzichtet. Nach einer Zentrifugation (15 000g, 5 min) wurden die Proteasen durch eine SDS-PAGE (Kap. 2.5.2) aufgetrennt und durch einen Western Blot (Kap. 2.6.3) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Diese wurde in einer Substratlösung (0,2 mM Peptidyl-pNA in 20 mM Tricine pH 8,0) für 5 min bei Raumtemperatur feststehend inkubiert. Freiwerdendes gelbes

Nitroanilin wurde zur Kontrastverstärkung in einen roten Azofarbstoff umgewandelt. Die zugrunde liegende chemische Reaktion zeigt Abb. 2.1. Die so hervortretenden Banden zeigen aufgrund der spezifischen proteolytischen Substratreaktionen indirekt die Positionen der Proteasen an.

Irreversible Protease-Inhibitoren (TLCK, TPCK, E-64, etc.) wurden den Proben bereits vor der SDS-PAGE hinzugefügt, während reversible Inhibitoren (SBTI, EDTA, EGTA, PLG-NHOH, Phosphoramidon, etc.) erst in den Substratlösungen enthalten waren.

Die Proteinstandards wurden durch Färbung der diese Spuren enthaltenden Membranbereiche mit 0,1 % Amidoschwarz, 2 % Essigsäure für 1 min und Entfärbung mit 2 % Essigsäure sichtbar gemacht. Zur Bestimmung der molekularen Massen siehe Kap. 2.5.2.

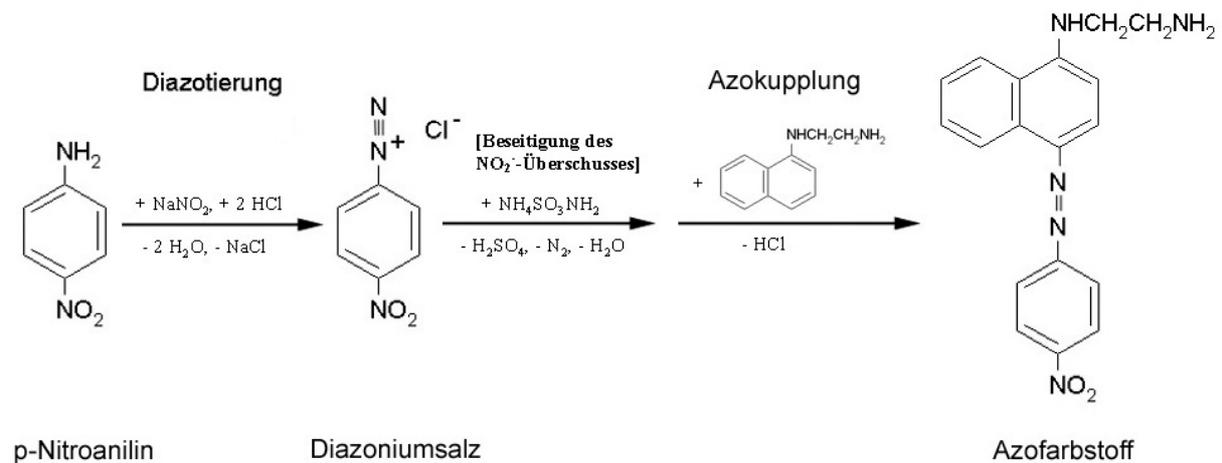


Abb. 2.1 Diazotierung und Azokupplung von Nitroanilin zur Kontrastverstärkung.

2.3.5 Zymogramme

Durch diese modifizierte SDS-PAGE-Technik war es möglich, Proteasen in SDS-Polyacrylamidgelen darzustellen, die während eines Gellaufs nicht irreversibel inaktiviert werden. Die Probenvorbereitung erfolgte wie bei den Aktivitätsblots (Kap. 2.3.4). Da diese nicht vollständig denaturierend war, konnten die beobachteten Positionen der Banden im Gel von den wirklichen molekularen Massen abweichen, in der Regel aber nicht mehr als 5 % im Vergleich zur Standard-SDS-PAGE (Kap. 2.5.2). Wenn nicht näher definiert, wurden 15 %ige Gele eingesetzt.

Zwei verschiedene Techniken müssen unterschieden werden:

Copolymerisationszymogramme. Nach einer Technik von Heussen (1980) wird ein SDS-Polyacrylamid-Gel zusammen mit einem Proteinsubstrat, hier 0,1 % Casein, polymerisiert. Im Anschluß an die SDS-PAGE wird das ionische Detergens durch eine einstündige Inkubation des Gels in 2,5 % Triton X-100 bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken ausgewaschen, gefolgt von einer 20-minütigen Inkubationsphase mit einem für Substratreaktionen günstigen Puffer, hier 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM CaCl_2 (A-Puffer).

Diffusionszymogramme. In diesem Fall lässt man das Proteinsubstrat, hier 2 % Casein, gemäß Garcia-Carreno (1993) erst nach der SDS-PAGE durch eine 30-minütige Inkubation bei 4°C in das Gel penetrieren. Im Anschluss wird das Gel für 1 h bei Raumtemperatur vorsichtig in derselben Lösung geschwenkt.

Diffusionszymogramme haben den Vorteil, dass das während der SDS-PAGE noch nicht vorhandene Proteinsubstrat nicht von Proteasen, die auch unter SDS-Bedingungen aktiv sind, abgebaut werden kann. Hierdurch kommt es nicht wie bei den Copolymerisationszymogrammen zu einer Schmierbildung aufgrund von Abbau des Substrats während des Laufs. Die Methode ist jedoch weniger sensitiv wie die der Copolymerisationszymogramme.

Wie bei den Aktivitätsblots wurden den Proben die irreversiblen Protease-Inhibitoren bei beiden Techniken bereits vor der SDS-PAGE hinzugefügt, während die reversiblen Inhibitoren erst in den nachfolgenden Inkubationspuffern enthalten waren.

Die Gele wurden zumeist übernacht, mindestens jedoch 4 h in 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,5 % Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt und die Überfärbung mit 20 % Ethanol, 7 % Essigsäure reduziert.

Klare Banden/Bereiche, die sich vom dunkelgefärbten Proteinhintergrund abhoben, zeigten die Positionen an, an denen durch proteolytische Aktivität Substrat abgebaut worden war.

Zur Bestimmung der molekularen Massen siehe Kap. 2.5.2.

2.4 Weitere Charakterisierung des Darmmilieus

2.4.1 pH-Messungen

Die Bestimmung der pH-Werte von Lösungen erfolgte bei größeren Volumina mit einer üblichen pH-Elektrode an einem CG 820-pH-Meter von Schott. Bei Probenvolumina im µl-Bereich wurde das Digital pH 525 von WTW, Weilheim mit angeschlossener Mini-Elektrode InLab 423 von Mettler Toledo eingesetzt.

Zur Kalibrierung der Geräte wurden Referenzlösungen (pH 4, pH 7, pH 9, pH 11) der Firma Grüssing GmbH, Filsum herangezogen.

Das Einstellen der pH-Werte erfolgte durch Zugabe von 100 mM – 10 M NaOH bzw. HCl-Lösungen bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer.

2.4.2 Redoxpotentialmessungen in situ und in vitro

Das Redoxpotential der bei den proteolytischen Cry8C-in vitro-Versuchen (Kap. 2.5.1) verwendeten Ansätze (Darmsaft, Toxinpräparationen etc.) sowie der präparierten Darmabschnitte (Kap. 2.2.5) wurde mit einer kombinierten Mikroelektrode (s. u.) bestimmt. Hierzu wurde die Platin-Elektrode in die Pufferlösung gehalten, bzw. in einen Darmabschnitt hineingestochen und einige Minuten gewartet, bis das sich langsam einstellende Potential einen konstanten Messwert erreichte. Da gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode gemessen wurde, musste der Messwert um die Verschiebespannung 199 mV (= Standardreduktionspotential der Ag/AgCl-Halbzelle) korrigierend erhöht werden, um das gemessene Potential zu standardisieren, d. h. zur Normalwasserstoffelektrode ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- = \text{H}_2$, per Definition mit

Standardreduktionspotential 0 mV) in Beziehung setzen zu können. Bei den dargestellten Ergebnissen ist dies berücksichtigt worden.

Redoxpotentialelektroden müssen vor Gebrauch nicht kalibriert werden, wohl aber auf Verschmutzungen kontrolliert werden, die die Messungen beeinflussen können. Zur Kontrolle wurden deshalb Lösungen mit bekannten Potentialen eingesetzt, nämlich das Chinhydron-System (Abb. 2.1), das abhängig von Temperatur und pH der redoxaktiven Lösung die nachstehend aufgeführten Sollwerte liefert Tab. 2.1. Aufgrund des oxidierenden Einflusses des Luftsauerstoffs mussten diese stets frisch angesetzt werden, da sich nach einigen Stunden bei Raumtemperatur Potentialabweichungen bemerkbar machten. Gemäß Herstelleranweisung wurden mit Chinhydron gesättigte Acetat-Puffer (50 mM Natriumacetat, 50 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 4,0 bzw. pH 7,0) angesetzt und die gemessenen Potentiale überprüft.

Tab. 2.1 Redoxpotentiale für Chinhydron-Lösungen, ± 20 mV erlaubte Toleranz; Angaben ohne Einberechnung der Verschiebespannung.

	20°C	25°C	30°C
pH 4	+268	+263	+258
pH 7	+92	+86	+79

Die Platin-Elektrode wurde zwischen den Messungen mit dH₂O gespült. Eine Reinigung mit Chrom-/Schwefel- oder Salpetersäure aufgrund abweichender Tabellenwerte wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht erforderlich. Die mittelfristige Aufbewahrung der Elektrode erfolgte in einer 100 mM KCl-Lösung, die längerfristige in der Originalverpackung mit Feuchtigkeitskissen.

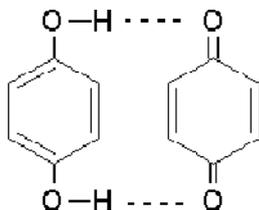


Abb. 2.1 Eine äquimolare Mischung von p-Benzochinon (Oxidationsmittel) und Hydrochinon (Reduktionsmittel) bildet den alternierend angeordneten Molekülkomplex Chinhydron. Eine gesättigte, gepufferte Lösung eines solchen Donor-Akzeptor-Komplexes wird häufig als Standard-Vergleichselektrode eingesetzt (Streitwieser 1986).

Verwendete Geräte und Materialien:

- Mikroelektrode (Microelectrodes Inc., Bedford, NH 03110-6805 USA, Nr. MI-800/4152, Ag/AgCl Referenzelektrode, minimal messbares Volumen: 0,5 μ l, Spezialanfertigung mit DIN 19262-Stecker)
- mV-Meter: WTW, Microprocessor pH/ION-Meter pMX 3000
- Chinhydron (Sigma, 1:1 Gemisch aus Benzochinon und Hydrochinon)

2.4.3 Phenoloxidase-Aktivitätstest

Die Bestimmung von Phenoloxidase-Aktivitäten erfolgte durch eine modifizierte photometrische Methode nach Jiang (1998). Hierbei wurde der Extinktionsanstieg pro Zeiteinheit bei der Oxidation von Dopamin zu Dopaminchinon bei 450 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz mit $\epsilon_{450 \text{ nm}} = 10\,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Neben den Darmsäften und den BBMV diente die Hämolymphe von *M. melolontha* als Kontrollprobe. Diese wurde bei der in Kap. 2.2.4 geschilderten Methode aufgefangen und ohne Abtrennung der Hämocyten¹ bei -70°C bis zur Verwendung eingefroren.

Verwendete Lösungen:

- Phosphatpuffer: 50 mM Na₃PO₄ pH 7,0
- Substratlösung: 2 mM Dopamin in Phosphatpuffer
- Testlösung: 10 µl Probe + 390 µl Phosphatpuffer + 100 µl Substratlösung

2.5 Toxin und Proteasen

2.5.1 Proteolytische Versuche

Bei den proteolytischen Versuchen wurden gereinigte Protoxin-Kristalle oder gelöstes Toxin zusammen mit Proteasen verschiedener Herkunft (käufliche Proteasen, selbst gereinigte Proteasen) und Zusammensetzung (Einzelproteasen, multiple Proteasen eines Darmsafts) in vitro bei definierten Bedingungen (reduzierend, chaotrop, etc.) inkubiert. Die Inkubationen erfolgten bei 25°C auf einem Eppendorf-Schüttler.

Die proteolytischen Reaktionen wurden wie bei Sugimura (1997) durch eine zweiminütige Inkubation bei 95°C gestoppt, um einen SDS-Effekt² während der anschließenden Probenvorbereitung zur SDS-PAGE (Kap. 2.5.2) zu vermeiden.

2.5.2 SDS-PAGE und Auswertung der Banden

Die Proben für die SDS-PAGE wurden mit 4-fach konz. reduzierendem Denaturierungspuffer (Roth, Roti-Load1, Nr. K929.1) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, 10 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 15 000 g zentrifugiert. Sodann erfolgte das Laden der Gele.

Die Präparation von SDS-Polyacrylamidgelen und die Durchführung der Gelelektrophorese basierte auf den von Sambrook (1989) beschriebenen Standardmethoden zur SDS-PAGE von Proteinen. Ergänzend hierzu seien folgende Spezifikationen genannt:

Die Gele wurden mit einer entgastem Acrylamid-Fertiglösung und den unten aufgeführten Puffern hergestellt. Über Dimensionen und Vernetzungsgrade gibt Tab. 2.1 Auskunft. Der

¹ Die Phenoloxidase-Aktivität ist mit den Hämocyten assoziiert.

² Hierbei handelt es sich um eine unerwünschte Nebenreaktion zwischen der Zugabe des Lämmli-puffers und dem Aufkochen der Probe, bei der SDS-resistente Proteasen entfaltete Proteinsubstrate an internen Schnittstellen spalten und so das Ergebnis der nativen proteolytischen Versuche verfälschen (Inagaki 1992).

Gel-Lauf erfolgte in einer selbstgefertigten Minigelkammer bei 150 mV für ca. 1 h bis zum Austreten der Farbfront. Die Gele wurden bei Raumtemperatur 1 h in Färbelösung geschwenkt und die Überfärbung durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung reduziert. Die Bestimmung der molekularen Massen einzelner Proteinbanden erfolgte über die Verwendung von Proteinstandards (u. a. Marker 69810 und 69811 der Firma Fluka) mit dem BioDocAnalyze Programm von Biometra.

Tab. 2.1 Dimensionen und Polymerisationsgrad der Minigele

	Volumen	Länge	Breite	Dicke	Vernetzung
Sammelgel	1 ml	1,5 cm	8 cm	0,083 cm	3,75 %
Trenngel	3 ml	4,5 cm	8 cm	0,083 cm	nach Bedarf

Verwendete Materialien und Lösungen:

- Glasplatten, Spacer, Käbme, Vaseline, Klammern
- Acrylamid-Fertiglösung: Roth, Rotiphorese Gel 30, 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
- Sammelgelpuffer: 12,5 ml Acrylamid-Lösung, 12,5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 ad 100 ml dH₂O
- Trenngelpuffer: x ml Acrylamid-Lösung (Menge abhängig von gewünschtem Polymerisationsgrad), 12,5 ml 3 M Tris/HCl pH 8,8 ad 100 ml dH₂O
- Sammelgel: 5 ml Sammelgelpuffer, 25 µl 20 %ige SDS, 25 µl APS, 5 µl TEMED
- Trenngel: 10 ml Trenngelpuffer, 50 µl 20 %ige SDS, 25 µl APS, 3 µl TEMED
- Elektrodenpuffer: 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
- Färbelösung: 1 g Coomassie Brillant Blue R, 45 % Ethanol, 10 % Essigsäure ad 1 l dH₂O, filtriert
- Entfärbelösung: 20 % Ethanol, 7 % Essigsäure in dH₂O

2.6 Weitere Techniken

2.6.1 Dialyse

Zur Entfernung niedermolekularer Bestandteile (DTT, Ionen wie (NH₄)₂SO₄, Oligopeptide, etc.) wurden die Proben unter leichtem Rühren für 16 h bei 4°C mit Servapor Dialyseschläuchen (regenerierte Cellulose, Nr. 44144, Ausschlussgrenze 12-14 kDa) gegen einen definierten Puffer dialysiert.

Die Schläuche wurden zuvor folgendermaßen bereitgestellt: Zur Entfernung von Konservierungsstoffen wie Schwermetallen, Chloridionen und Glycerol wurde das Material gemäß Herstelleranleitung 15 min in 1 mM EDTA gekocht und sodann bei 4°C in 70 %igem Ethanol gelagert. Dieses wurde unmittelbar vor Verwendung der Schläuche mit dH₂O ausgespült.

2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Testlösungen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Rinderserumalbumin-Lösungen mit Konzentrationen von 0 – 2 mg/ml wurden als Standard benutzt.

2.6.3 Western Blot

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden durch das Semi-dry-Verfahren auf eine Membran übertragen. Bei der Anfertigung von Aktivitätsblots (Kap. 2.3.4) wurde hierzu eine Nitrocellulose-Membran eingesetzt, die unmittelbar vor dem Blotaufbau für 5 min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Bei Western Blots für die N-terminalen Ansequenzierungen von Polypeptiden (Kap. 2.6.4) wurde eine PVDF-Membran verwendet, die zunächst für 5 min in Methanol aktiviert wurde und anschließend, zusammen mit dem Trenngel, für 10-15 min in Transferpuffer äquilibriert wurde.

Auf die untere Kohlelektrodenplatte (Anode) wurden zuerst 6 Lagen mit Transferpuffer getränktes Filterpapier einzeln aufeinandergelegt. Darauf wurden die Membran und das Gel gelegt, gefolgt von 6 weiteren Lagen einzeln getränktem Filterpapier. Ein Einschluss von Luftblasen zwischen den Schichten, die den Proteintransfer behindern würden, wurde vermieden. Der gesamte Aufbau wurde nun mit einer zweiten Elektrodenplatte (Kathode) verschlossen. Pro cm² Gelfläche wurde bei einer Transferdauer von 2 h eine Stromstärke von 0,8 mA angelegt.

Verwendete Materialien und Lösungen:

- Semi-dry Blotter: Sigma-Aldrich
- PVDF-Membran: Porablot, Porenweite 0,2 µm, Machery-Nagel
- Nitrocellulose-Membran: Schleicher & Schuell, Porenweite 0,45 µm
- Whatman-Filterpapier Cat No 3030917
- Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 8,3, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

2.6.4 Analyse N-terminaler Peptidsequenzen

Das N-terminale Ansequenzieren von Proteinen (das Darmsaft-Astacin, das 55 kDa Cry8C Fragment) erfolgte nach dem Edman-Verfahren durch Dr. T. Kempff am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ). Zur Vorbereitung wurde eine PVDF-Membran, auf die die gewünschten gereinigten Proteine mittels Western Blot (Kap. 2.6.3) transferiert worden waren, 1 min gefärbt, 30 min entfärbt, 5 min in dH₂O gewaschen und für ca. 8 h getrocknet.

Verwendete Lösungen:

- Färbelösung: 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G250, 40 % Methanol, 10 % Essigsäure
- Entfärbelösung: 40 % Methanol, 10 % Essigsäure

2.7 Computergestützte Informationssuche und Literaturrecherche

Die folgende Aufstellung gibt einen Überblick über hilfreiche und in dieser Arbeit häufig verwendete Informationsquellen aus den Bereichen der Proteasen-Forschung, der biologischen Schädlingsbekämpfung, inklusive der *Bacillus thuringiensis*-Forschung, sowie Angaben über die allgemeine Literaturrecherche.

Protease-Datenbanken und allg. Protease-Informationen:

MEROPS: <http://www.merops.co.uk/>

BRENDA: <http://brenda.bc.uni-koeln.de/>

Insect Proteinase Database: <http://bru.usgmrl.ksu.edu/db/proteinases/>

Enzyme Nomenclature: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>

Wichtige Datenbanken und Homepages im Bereich der biologischen Schädlingsbekämpfung:

BT Nomenklatur,: http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html

Bipesco: <http://bipesco.uibk.ac.at/>

Biological control, Cornell Universität: <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/>

Integrierte Schädlingsbekämpfung: <http://www.colostate.edu/Depts/IPM/index.html>

US-Forstinsekten und Schadbilder: <http://www.fs.fed.us/r6/nr/fid/coolent.shtml>

Ausgewählte Forschungsgruppen mit verwandten Arbeitsgebieten:

B. Oppert (BT-Resistenzen und Insektenproteasen):

<http://bru.usgmrl.ksu.edu/sci/oppert/index.asp>

M. Friedrich (Terrestrische Mikrobiologie, Redoxvorgänge):

<http://www.uni-marburg.de/mpi/friedrich/friedrich.html>

A. Brune (Mikrobielle Ökologie von Darmsystemen, Redoxvorgänge):

<http://profile.biologie.uni-konstanz.de/brune/default.htm>

D. Lopes (Japankäfer) : <http://www.angra.uac.pt/pessoais/docentes/dlopes/index.html>

Liste von Melolontha-Gruppen: <http://bipesco.uibk.ac.at/index2.html>, sowie

<http://www.zoo.uni-heidelberg.de/schnetter/>

W. Stöcker (Astacin-Forschung):

<http://www.uni-muenster.de/Biologie/zoophysiology/molphys/>

Suche nach Protein-Sequenz-Ähnlichkeiten:

Die N-terminalen Aminosäure-Sequenzen wurden über BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool, Kategorie Proteine, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) der NCBI-Datenbank mit bekannten Proteinen hinsichtlich ihrer Sequenz-Ähnlichkeiten verglichen. Hierzu wurden die Default-Einstellungen mit Ausnahme des Erwartungswertes, der von 10 auf 1000 bzw. 10000 erhöht wurde, beibehalten. Die Suche erfolgte in der Swissprot-Datenbank. Im Falle des Darmsaft-Astacins von *M. melolontha* wurde das initiale Alignment zur Verbesserung der Übersichtlichkeit durch Korrekturen von Hand ergänzt. Zudem wurde der NCBI Taxonomy Browser (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>) zur Spezifizierung der beim Alignment auftretenden Abkürzungen der Arten eingesetzt.

Primärstruktur-Analyse von Cry8C-Abbaufragmenten:

Die Bestimmung der Molekularmassen und der Anzahl der Aminosäuren von Abbaufragmenten des BTJ-Toxins wurde mit den öffentlich zur Verfügung stehenden Anwendungen des ExPASy (Expert Protein Analysis System proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics) durchgeführt. Zur Homepage gelangt man unter <http://kr.expasy.org/tools/#primary>.

Allgemeine Literaturrecherche:

Die Recherche in bibliographischen Datenbanken wie Biosis, Medline, Current Contents, Zoological Records etc. im Bereich Medizin/Biologie erfolgte über das Online-Angebot der Universitätsbibliothek der Universität Heidelberg:
<http://www.ub.uni-heidelberg.de/epub/fach/medbio.html>

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Proteasen im Mitteldarm von *M. melolontha*

3.1.1 Identifizierung der Endopeptidasen im Darmsaft

Zur Analyse der Zusammensetzung und der Molekularmassen der vorliegenden Endopeptidasen wurden zwei verschiedene Zymogramm-Techniken (siehe Kap. 2.3.5) eingesetzt, bei denen es sich um modifizierte SDS-PAGEs handelt, in deren Anschluss proteolytische Aktivitäten indirekt durch den unspezifischen Abbau eines Proteinsubstrates, hier Casein, nachgewiesen werden können. Es muss allerdings betont werden, dass Zymogramme nur teilweise denaturierend sind (siehe Kap. 2.3.5) und demzufolge die beobachteten Molekularmassen von den tatsächlichen Größen abweichen können.

Zur Analyse der Endopeptidasen (Abb. 3.1) erwiesen sich Darmsaft-Verdünnungen zwischen 1:10 und 1:100 am besten geeignet. Dieser weite Bereich wurde aufgrund der unterschiedlich starken Aktivitäten notwendig, die wie folgt charakterisiert werden können:

Durch beide Techniken konnten Aktivitäten bei 14, 18 und 23 kDa identifiziert werden, die allerdings nur bei geringen Darmsaft-Verdünnungsfaktoren (hier 1:10) darstellbar sind. Eine Bestimmung der weiteren Endopeptidasen durch Copolymerisationszymogramme (Abb. 3.1A) war nur sehr eingeschränkt möglich, da es sich hier um starke Aktivitäten handelte, die bereits während der Gelelektrophorese unter SDS-Bedingungen Casein spalteten, was zu einem Schmier im oberen Bereich der Gele führte. Ein Absenken der SDS-PAGE-Inkubationstemperatur auf 4°C oder die Verwendung anderer Probenpuffer konnte diesen proteolytischen Effekt nicht unterdrücken.

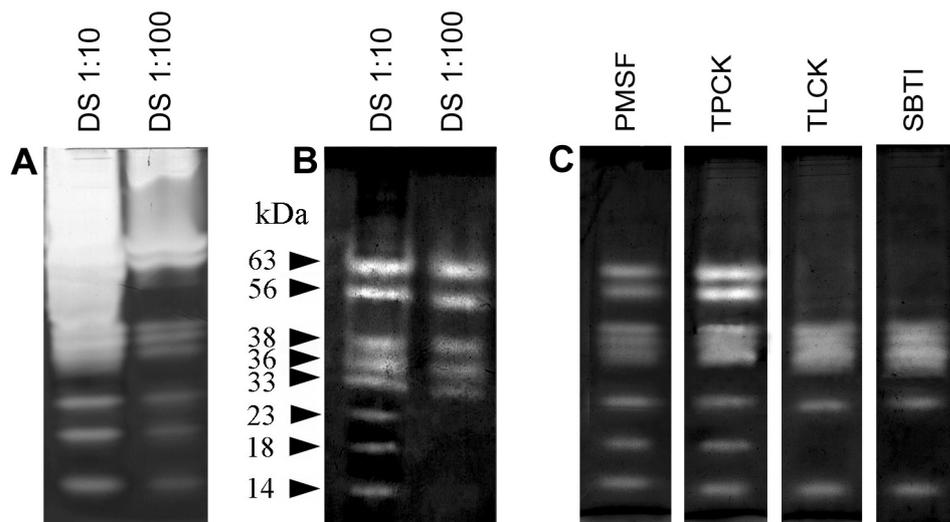


Abb. 3.1 Endopeptidasen im Darmsaft (DS) von *M. melolontha* (L3) und Nachweis von Serinproteasen. (A) Copolymerisationszymogramm nach der Methode von Heussen (1980); (B,C) Diffusionszymogramme nach Garcia-Carreno (1993). Analysiert wurde 1:10 verdünnter DS (14 µg Protein) und 1:100 verdünnter DS (1,4 µg Protein). (C) Inhibition des 1:10 verdünnten DS mit Serinprotease-Inhibitoren durch Präinkubation mit 400 µM PMSF, 400 µM TPCK, 400 µM TLCK, und Coinkubation mit 100 µg/ml SBTI.

Daher wurde mit den Diffusionszymogrammen eine, wenngleich etwas weniger sensitive, Methode benutzt, bei der das Caseinsubstrat erst im Anschluss an die SDS-PAGE ins Gel penetrierte (Abb. 3.1B,C). In der Tat konnte die Schmierbildung so unterbunden werden und weitere Endopeptidasen eindeutig identifiziert werden, nämlich zwei Aktivitäten bei 56 und 63 kDa, sowie drei zwischen 30 und 40 kDa.

Darüber hinaus konnten in Copolymerisationszymogrammen Aktivitäten >100 kDa bestimmt werden.

3.1.2 Spezifität der Darmsaft-Proteasen

Die Proteasen des Darmsafts wurden mit spezifischen Inhibitoren und synthetischen Farbsubstraten biochemisch näher charakterisiert.

Trypsinartige Serinproteasen wurden in Zymogrammen durch Zugabe des hochspezifischen Trypsin-Inhibitors TLCK und des etwas geringer spezifischen Trypsin-Inhibitors der Sojabohne (SBTI) bestimmt (Abb. 3.1C). Hierdurch wurden die Aktivitäten bei 56 und 63 kDa fast vollständig, sowie die Aktivität bei 18 kDa zumindest weitgehend gehemmt, während die restlichen Banden keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.1B) zeigten.

Zur weiteren Charakterisierung der trypsinartigen Aktivitäten wurden photometrische Tests mit BApNA durchgeführt (Abb. 3.2), einem für Trypsine geeigneten chromogenen Substrat mit der Aminosäure Arginin an der P1 Position. In Kombination hierzu wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt, die alle bekannten Proteasen-Klassen abdecken. Hierbei zeigte sich, dass wiederum SBTI und TLCK die am besten geeigneten Inhibitoren zur Hemmung der Substratreaktion sind, während typische Metallo-, Aspartat- und Cysteinproteasen-Inhibitoren keine Wirkung zeigten (1,10-Phenanthrolin, Pepstatin, E-64; ohne Abb.). Hingegen zeigten die Chelatbildner EDTA und das Ca^{2+} -spezifische EGTA eine hemmende Wirkung, was auf eine Beteiligung von Ca^{2+} an der Reaktion oder auf die Existenz eines metallischen Cofaktors hindeutet.

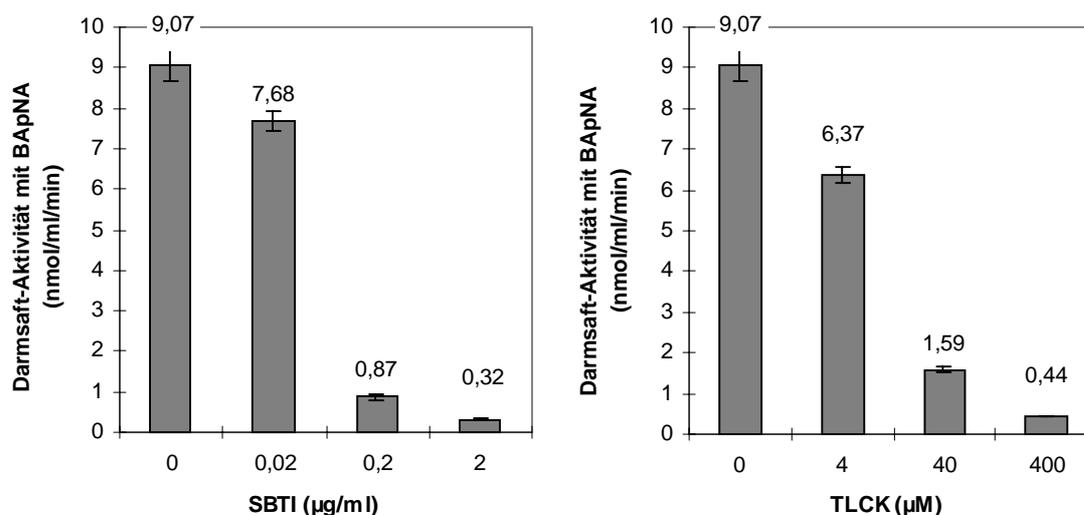


Abb. 3.2 Photometrischer Aktivitätstest mit 10 μl 1:10-verdünntem DS (14 μg Protein) und 0,2 mM BApNA als Substrat für trypsinartige Serinproteasen. Als effektivste Inhibitoren der Substratreaktion erwiesen sich SBTI und TLCK, während Inhibitoren anderer Protease-Klassen keinen Effekt zeigten (nicht dargestellt).

Mit Aktivitätsblots konnte gezeigt werden, dass die BApNA-Spaltung von den beiden Aktivitäten bei 56 und 63 kDa verursacht wird (Abb. 3.3B). Wiederum konnte die Substratreaktion mit SBTI (100 µg/ml, nicht gezeigt) und TLCK (Abb. 3.3C) gehemmt werden. Im Gegensatz zu den Zymogramm-Analysen konnte – auch bei Verlängerung der Inkubationszeit – bei der 18 kDa-Aktivität kein Signal nachgewiesen werden.

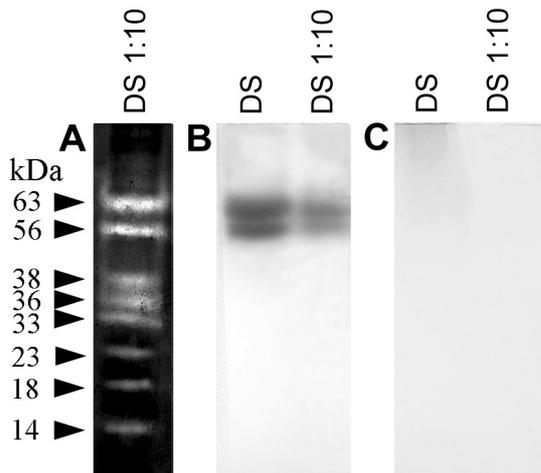


Abb. 3.3 Zuordnung der trypsinartigen Serinproteasen zu den Zymogramm-Aktivitätsbanden. (A) Kontroll-Zymogramm des 1:10 verdünnten DS. (B, C) Aktivitätsblots des DS mit 0,2 mM BApNA als Substrat. (B) Ohne Inhibitoren; (C) mit 200 µM TLCK. Analysiert wurde unverdünnter DS (140 µg Protein) und 1:10 verdünnter DS (14 µg Protein).

Der Einsatz des generellen Serinprotease-Inhibitor PMSF in Zymogrammen bewirkte bei den 56 und 63 kDa-Aktivitäten eine leichte Hemmung, während die schwache Aktivität bei 18 kDa im Vergleich zur Kontrolle unverändert blieb (Abb. 3.1C). Zudem konnte eine Abschwächung der Aktivitäten zwischen 30 und 40 kDa beobachtet werden, was vermuten ließ, dass es sich hierbei um eine der zwei noch verbleibenden Gruppen von nicht-trypsinartigen Serinproteasen handeln könnte – elastaseartigen oder chymotrypsinartigen Serinproteasen.

Elastaseartige Serinproteasen wurden wie folgt bestimmt. Photometrische Tests mit SAAPpNA, einem geeigneten Substrat für Elastasen, lieferten eine Substratreaktion, die mit den Serinprotease-Inhibitoren SBTI und PMSF, sowie dem Elastase-spezifischen Elastatinal effektiv gehemmt werden konnten (Abb. 3.4).

Mit Aktivitätsblots konnte gezeigt werden, dass die chromogene Reaktion mit den drei Aktivitäten zwischen 30 und 40 kDa assoziiert ist (Abb. 3.5B). Auch hier konnten die Substratreaktionen mit den genannten Inhibitoren deutlich, aber nicht vollständig, gehemmt werden (Abb. 3.5C-E). Der Einsatz von SAAPLpNA und STANA führte zu den gleichen Ergebnissen (ohne Abb., siehe jedoch auch Abb. 3.19B). Neben dem Spektrum der wirksamen Inhibitoren zeigten auch die verwendeten Substrate, die kleine ungeladene Aminosäuren an der P1 Position besitzen, dass man diese Aktivitäten den elastaseartigen Serinproteasen zurechnen muss.

Chymotrypsinartige Serinproteasen konnten mit keiner der o. a. Nachweismethoden bestimmt werden. Zur Anwendung kamen der Chymotrypsin-Inhibitor TPCK (Abb. 3.1C), sowie das chromogene Substrat AcFpNA.

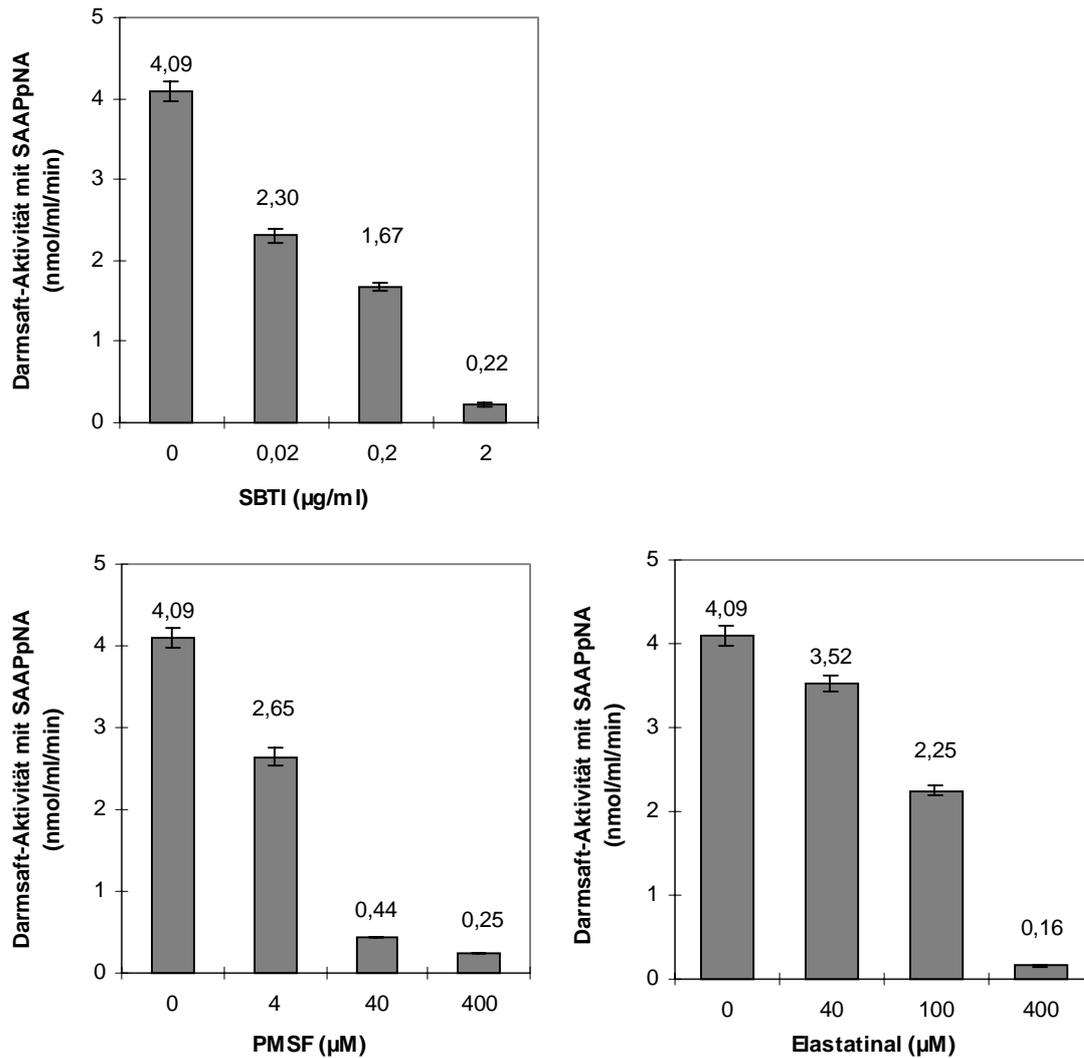


Abb. 3.4 Photometrischer Aktivitätstest mit 10 µl 1:10-verdünntem DS (14 µg Protein) und 0,2 mM SAAPpNA als Substrat für elastaseartige Serinproteasen. Als effektivste Inhibitoren der Substratreaktion erwiesen sich SBTI, PMSF und Elastatinal.

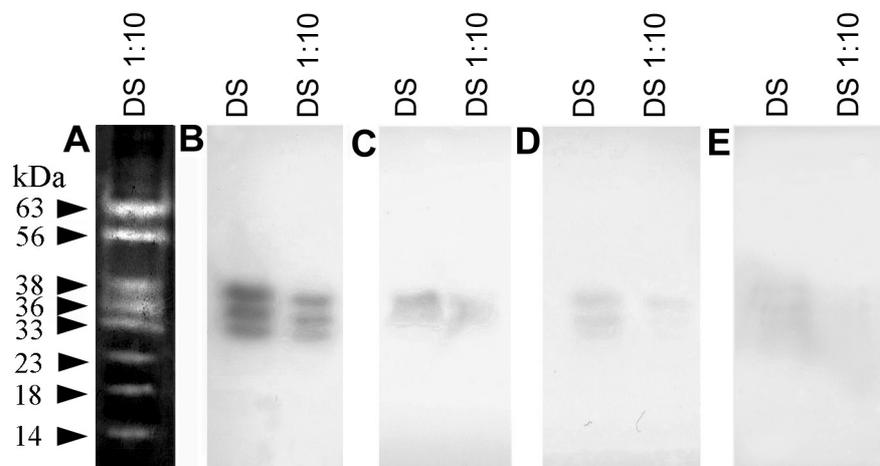


Abb. 3.5 Zuordnung der elastaseartigen Serinproteasen zu den Zymogramm-Aktivitätsbanden. (A) Kontroll-Zymogramm; (B-E) Aktivitätsblots des DS mit 0,2 mM SAAPpNA als Substrat. (B) Ohne Inhibitoren, (C) Einfluss von 1 mg /ml SBTI, (D) Einfluss von 400 µM PMSF, (E) Einfluss von 4 mM Elastatinal. Analysiert wurde unverdünnter DS (140 µg Protein) und 1:10 verdünnter DS (14 µg Protein).

Metalloproteasen wurden mit 1,10-Phenanthrolin bestimmt. 10 mM dieses Inhibitors hemmten die 14 und 23 kDa-Aktivitäten des 1:100 verdünnten Darmsafts vollständig (Abb. 3.6A). Die elastaseartigen Aktivitäten wurden zudem leicht gehemmt. Um diese Befunde zu spezifizieren wurden weitere Zymogramm-Analysen mit spezifischeren Metalloproteasen-Inhibitoren durchgeführt. Hierzu zählte Phosphoramidon, das allerdings keine Wirkung zeigte, und der Collagenase- und Astacin-Inhibitor PLG Hydroxamat. Letzterer führte zur kompletten Hemmung der Aktivitäten bei 14 und 23 kDa (Abb. 3.6C).

Zur weiteren Eingrenzung der vorliegenden Proteasen-Typen wurde mit Dns-PKFAPWV ein fluorometrisch einsetzbares Substrat gewählt, das von astacinartigen Metalloproteasen, nicht aber von Collagenasen gespalten werden kann. Tatsächlich konnte hiermit eine Substratreaktion nachgewiesen werden (Abb. 3.7), die wiederum mit 1,10-Phenanthrolin und PLG Hydroxamat gehemmt werden konnte, nicht jedoch mit Phosphoramidon oder Elastatinal. Letzterer Inhibitor wurde zur Überprüfung der elastaseartigen Aktivitäten eingesetzt.

Da Dns-PKFAPWV nicht in Aktivitätsblots eingesetzt werden kann – es ist kein diazotierbares Nitroanilid (s. Kap. 2.3.4) – konnte die identifizierte astacinartige Protease nicht einer der beiden Zymogramm-Banden bei 14 und 23 kDa zugeordnet werden.

Durch eine N-terminale Ansequenzierung (Kap. 3.1.4) konnte die Existenz eines Darmsaft-Astacins bei *M. melolontha* bestätigt werden. Hierbei handelte es sich um die Aktivität bei 23 kDa (Abb. 3.12B).

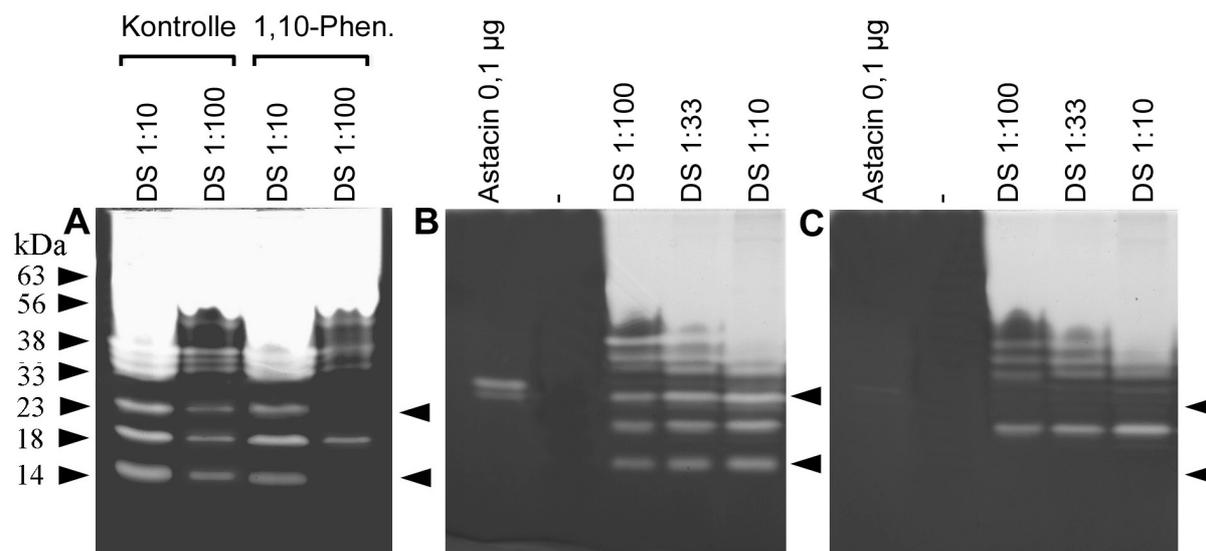


Abb. 3.6 Nachweis von Metalloproteasen durch Copolymerisationszymogramme. (A) Hemmung der Metalloproteasen durch Präinkubation der Proben mit 10 mM 1,10-Phenanthrolin. (B) Kontrolle für C ohne Inhibitor, (C) Coinkubation des Zymogramms mit 1 mM PLG Hydroxamat.

Cystein- oder Aspartatproteasen, die in der Regel mit E-64 oder Pepstatin nachgewiesen werden, konnten mittels Zymogramm-Analysen nicht nachgewiesen werden. Somit bleiben die caseinolytischen Aktivitäten >100 kDa übrig (Abb. 3.1A, DS 1:100), die trotz Abdeckung aller mechanistischen Inhibitor-Klassen nicht näher charakterisiert werden konnten.

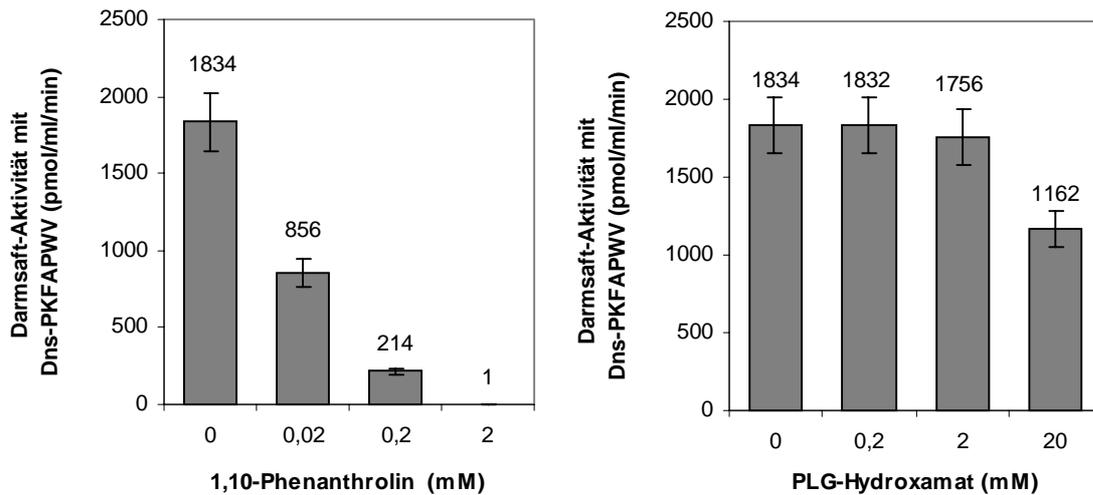


Abb. 3.7 Fluorometrischer Aktivitätstest mit 2 μ l 1:200 verdünntem DS (0,14 μ g Protein) und Dns-PKFAPWV als Substrat für astacinartige Metalloproteasen. Als effektivste Inhibitoren der Substratreaktion erwiesen sich 1,10-Phenanthrolin und PLG Hydroxamat.

Im Gegensatz zu den Endopeptidasen können Exopeptidasen wie Carboxypeptidasen oder Aminopeptidasen nicht durch Zymogramme, wohl aber in photometrischen Tests und Aktivitätsblots analysiert werden.

Aminopeptidasen wurden mit dem Substrat LpNA identifiziert. Die entsprechende Substratreaktion konnte sowohl in photometrischen Tests (Abb. 3.8), als auch bei der Durchführung von Aktivitätsblots (Abb. 3.9) mit dem spezifischen Aminopeptidasen-Inhibitor Bestatin effektiv gehemmt werden. Die Aktivität konnte auf eine einzelne Bande bei 80 kDa eingegrenzt werden.

Carboxypeptidasen konnten nicht nachgewiesen werden. Zur Anwendung kamen eine Reihe spezifischer Substrate wie N-CBZ-Phe-Ala, Hip-Phe und Hip-Arg.

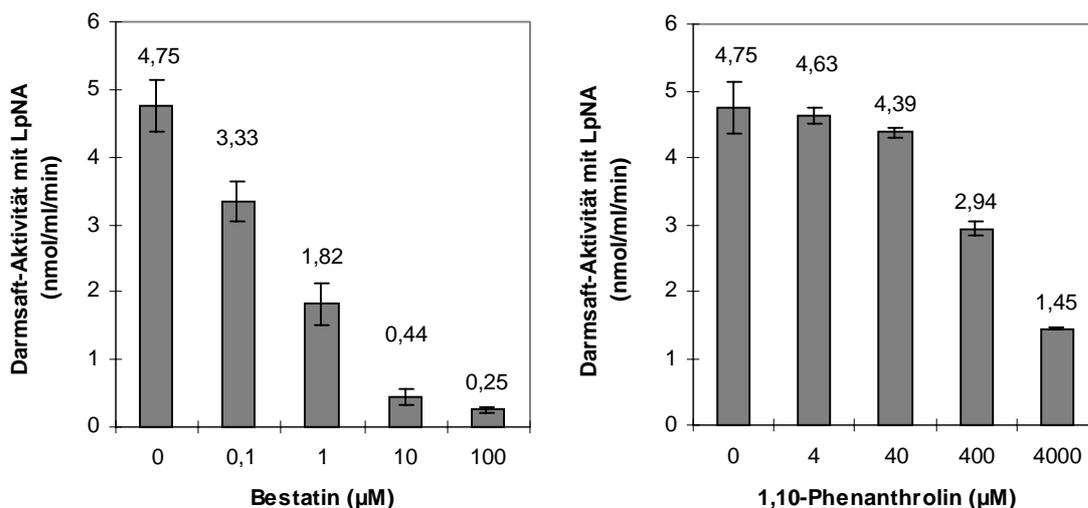


Abb. 3.8 Photometrischer Aktivitätstest mit 10 μ l 1:10-verdünntem DS (14 μ g Protein) und 0,2 mM LpNA als Substrat für Aminopeptidasen. Als geeignete Inhibitoren erwiesen sich Bestatin und 1,10-Phenanthrolin.

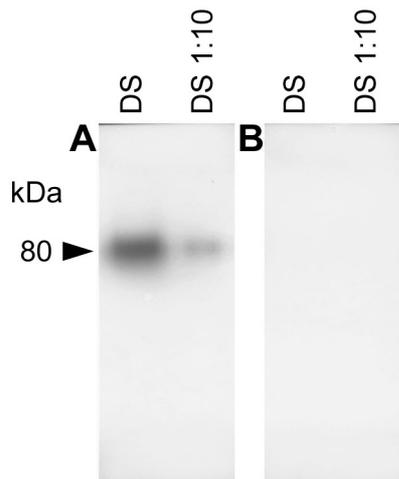


Abb. 3.9 Aktivitätsblots des DS (140µg Protein) mit 0,2 mM LpNA als Substrat zur Identifizierung der Aminopeptidase. (A) Ohne Inhibitor, (B) Coinkubation der Membran mit 1 mM Bestatin.

3.1.3 Membranständige Proteasen

Identifizierung

Zur Analyse der membranständigen Proteasen des Mitteldarms wurden Vesikel aus dem Mikrovillisaum der Darmepithelzellen präpariert (= BBMV, siehe Kap. 2.2.6). Deren Aktivitäten wurden wie die freien Proteasen des Darmsafts mit Zymogrammen, Aktivitätsblots und photometrischen Tests analysiert. Ergänzt wurden diese Untersuchungen durch eine kurze Charakterisierung der Art der Membranständigkeit.

Durch die Zymogramm-Analyse der BBMV konnte eine einzelne caseinolytische Aktivität bei 65 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.10A, siehe Pfeile). Diese wurde nicht näher charakterisiert. Das Ergebnis liefert jedoch aufgrund des Fehlens weiterer Banden für die in Abb. 3.11 dargestellten Versuche den Nachweis, dass die BBMV-Präparation nicht mit freien Proteasen des Darmsafts, insbesondere der freien Aminopeptidase (Abb. 3.10B, Spur 2), kontaminiert sind.

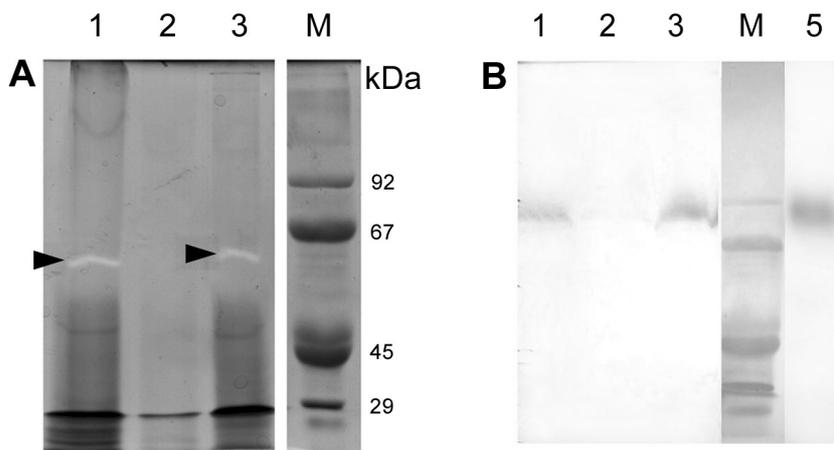


Abb. 3.10 Analyse der membranständigen Proteasen des Mitteldarmepithels. (A) 12 % Zymogramm, (B) 12 % Aktivitätsblot mit 0,2 mM LpNA als Substrat. Spur 1, BBMV-Suspension 1:10 (12 µg Protein); 2, in 1 Vol. A-Puffer aufgenommenes Pellet nach Behandlung der BBMV-Suspension mit Natriumdesoxycholat und Zentrifugation; 3, Überstand nach Behandlung der BBMV-Suspension mit Natriumdesoxycholat und Zentrifugation; 5, lösliche Aminopeptidase des Darmsafts (140 µg Protein).

Durch photometrische Tests (Abb. 3.; Nr. 4,5) und Aktivitätsblots (Abb. 3.1B) mit LpNA und Bestatin konnte gezeigt werden, dass das Mitteldarm-Epithel eine Aminopeptidasen-Aktivität aufweist, die ebenso wie die lösliche Form im Darmsaft eine Molekularmasse von etwa 80 kDa besitzt.

Charakterisierung der Art der Membranständigkeit

Membranständige Aminopeptidasen bei Lepidopteren sind durch einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker an die Epithelmembranen gebunden und fungieren u. a. als Rezeptoren der Lepidopteren-spezifischen Cry-Toxine. Die folgenden Versuche zur näheren Charakterisierung der Membranständigkeit dieser Exopeptidase bei *M. melolontha* sollten ansatzweise darüber Aufschluss geben, ob hier ähnliche Voraussetzungen gegeben sind.

Hierzu wurde zunächst versucht, die membranständige Aminopeptidase mit verschiedenen Detergenzien in Lösung zu bringen. Darunter befanden sich auch die folgenden drei, die bei GPI-verankerten Proteinen besonders effektiv wirken. Während mit CHAPS und n-Octyl- β -D-Glucopyranosid keine Freisetzung der Aktivität erzielt werden konnte, führte der Einsatz von Natriumdesoxycholat zu einer nahezu quantitativen Ablösung der Aminopeptidase von den BBMV (Abb. 3.11). Die dem Nachweis zugrundeliegende Substratreaktion konnte wiederum mit Bestatin effektiv gehemmt werden. Das zur Kontrolle eingesetzte nichtionische Detergens Triton X-100 zeigte praktisch keine Wirkung (< 1 %).

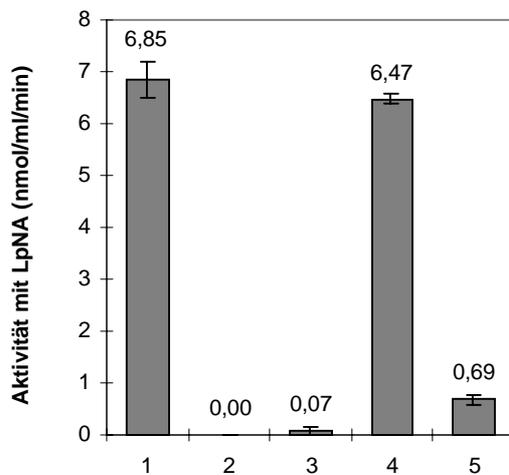


Abb. 3.11 Photometrischer Nachweis der membranständigen Aminopeptidase bei den BBMV des Mitteldarm-Epithels von *M. melolontha*. 1, BBMV-Suspension (12 μ g Protein); 2, Überstand nach Zentrifugation der BBMV-Suspension; 3, in 1 Vol. A-Puffer aufgenommenes Pellet nach Behandlung der BBMV-Suspension mit Natriumdesoxycholat und Zentrifugation; 4, Überstand nach Behandlung der BBMV-Suspension mit Natriumdesoxycholat und Zentrifugation; 5, Hemmung der Aktivität im Überstand mit 50 μ M Bestatin.

Ein spezifischerer Nachweis zur Untersuchung der Verankerungsart sollte mit der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) geführt werden. Als Aktivitäts-Indikator diente wiederum die LpNA-Substratreaktion. Eine Ablösung der Aktivität mittels PI-PLC konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle zur Bestätigung der Funktionsfähigkeit der PI-PLC-Aktivität diente ein Versuch, bei dem die GPI-verankerte Phosphatase der Schweineniere (*Sus scrofa*) abgelöst wurde; deren Aktivität wurde mit einer PNPP-Substratreaktion nachgewiesen (siehe Kap. 2.2.7).

3.1.4 Aufreinigung und N-terminale Ansequenzierung des Maikäfer-Astacins

Vertreter der Astacin-Familie sind bei Vertebraten und Invertebraten weit verbreitet, in ihrer Funktion als Verdauungsenzym bislang aber nur bei den dekapoden Crustacea beschrieben. Ein eindeutiger Nachweis eines Astacins im Darmsaft von *M. melolontha*, für den die bislang durchgeführten biochemische Funktionsuntersuchungen alleine nicht ausreichen, hätte somit eine große Bedeutung in Hinblick auf die Verbreitung dieser Aktivität als Verdauungsenzym. Durch die folgenden Untersuchungen wurde es möglich, die bisherigen Untersuchungen zu bestätigen und das Darmsaft-Astacin weiter zu charakterisieren.

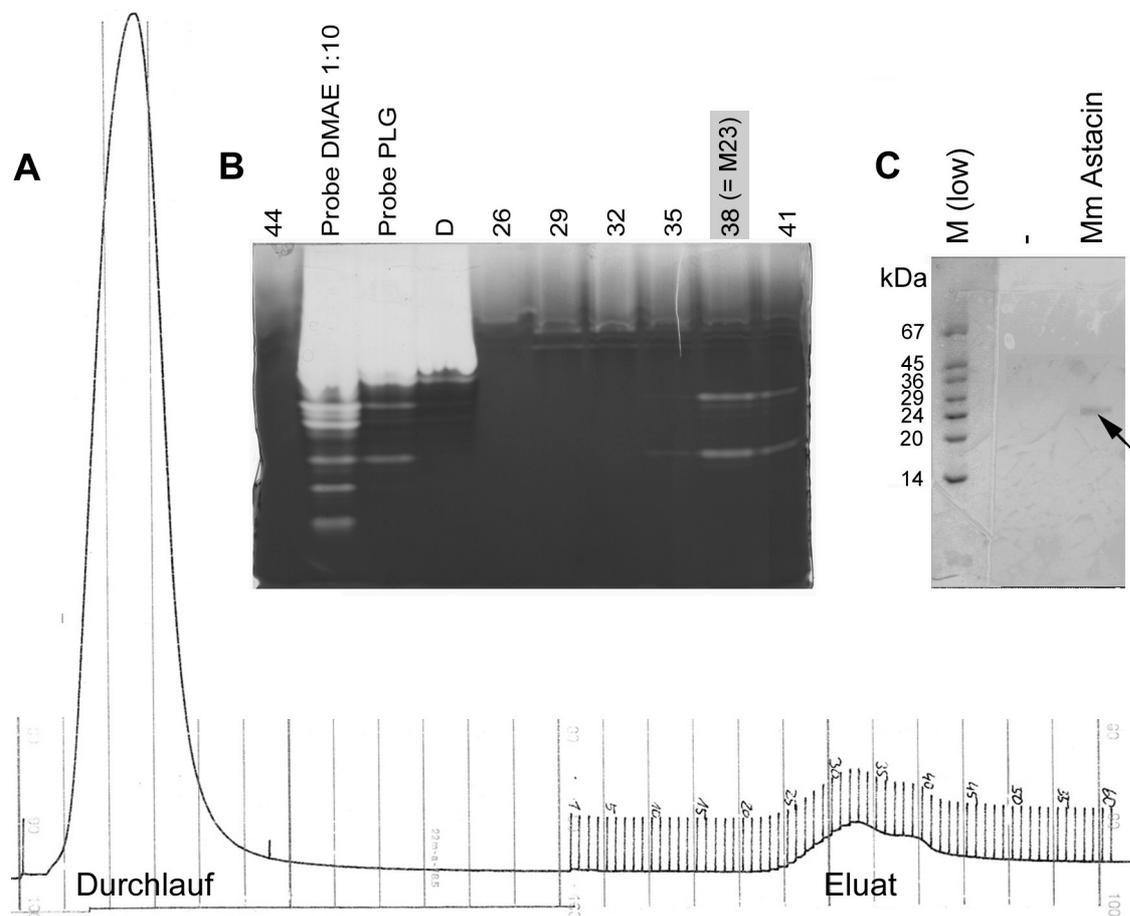


Abb. 3.12 Aufreinigung des Darmsaft-Astacins von *M. melolontha*. (A) Schreiberaufzeichnung der Affinitätschromatographie. Spezifischen Einstellungen: siehe Kap. 2.2.8; 2.2.9. (B) Zymogramm-Analyse der PLG-Hydroxamat-Affinitätschromatographie. Analysiert wurden die Probe der vorgeschalteten DMAE-Anionenaustauschchromatographie, sowie die aus der Affinitätschromatographie stammende Probe, der Durchlauf und Elutionsfraktionen. (C) Präparatives 15 % SDS-Gel zur Bereitstellung des Darmsaft-Astacins für die N-terminale Mikrosequenzierung. Als Probe dienen die gepoolten und konzentrierten Elutionsfraktionen aus B, die die gewünschte Aktivität aufwiesen. Auf eine Bestimmung der aufgetragenen Proteinmenge wurde wegen Materialmangels verzichtet. Die grau unterlegte Fraktion 38 (=M23) diente als Probe für die Untersuchungen in Kap. 3.6

Basierend auf der in Kap. 3.6.1 beschriebenen Bereitstellung von teilweise gereinigten Proteasen wurde in diesem Fall die DMAE-Anionenaustauschchromatographie unter weniger stringenten Bedingungen, nämlich bei pH 8,5, durchgeführt. Dies hatte zur Folge, dass das Darmsaft-Astacin nun neben den beiden anionischen trypsinartigen Proteasen im Durchlauf wiederzufinden war (Abb. 3.12 B „Probe PLG“). Diese Vorgehensweise wurde deshalb gewählt, um die gewünschte Aktivität weitgehend von den elastaseartigen Proteasen abzutrennen. Diese erwiesen sich nämlich bei der anschließenden PLG-Hydroxamat-Affinitätschromatographie als Störfaktor.

Die Affinitätschromatographie ermöglichte nun einen weiteren Aufreinigungsschritt, indem die anionischen Trypsine im Durchlauf blieben (Abb. 3.12 B, „D“), das gewünschte Darmsaft-Astacin aber spezifisch gebunden und eluiert werden konnte (Abb. 3.12B, Fraktionen 35-41, untere Bande). Eine weitere begleitende elastaseartige Restaktivität konnte nicht abgetrennt werden (siehe obere Bande). Die interessierenden Elutionsfraktionen wurden gepoolt, konzentriert und einer 15 % SDS-PAGE unterzogen. Hierdurch konnte eine Bande bei 24 kDa identifiziert werden (Abb. 3.12 C).

Die N-terminale Sequenz des aufgereinigten 24 kDa Polypeptids lautete NGLRDSEFMWPD AVIPYE. Ein Alignment mit verschiedenen Vertretern der Astacin-Familie zeigte einen hohen Grad an Übereinstimmung mit einzelnen konservierten Aminosäuren und der Abfolge EXXWPXXXVIPY (Abb. 3.13). Eine einzelne, möglicherweise zufällige Übereinstimmung zeigt die Sequenz NGLRD, die beim menschlichen Meprin A ebenfalls auftritt. Aufgrund dieser Ähnlichkeit kann man mit höchster Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass es sich bei der aufgereinigten Aktivität um ein Mitglied der Astacin-Familie handelt. Somit wären die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen bestätigt.

```

*          20          *          40          *
MM AST    : NGLRD--SEFMWPDVA-----IPYIE
AA AST    : -AAILG-DEYLWSSGV-----IPYTFAG-VS--GADQSA[LSG]M[OE]LEEK[TC]R[F]VPR
AA AEA    : NAGG---SMAWPKASEGFVV---IPYV[TD]OYD--KENIDIAIDAMAE[FD]EIT[CV]R[F]VPR
HV_HMP2   : -AALSN-SSILWLPNNKV---VPWSITKQLENTAEATFG[MAAF]REWEERS[CL]T[F]KRR
PC_PMP1   : NAFASI-KGGRWPGAK-----IAYQIERSIG--SGGR[TATA]NA[TAQY]HKHT[CL]R[F]HKK
HS_MEPA   : NGLRD--PNTRWTFP-----IPYILADNLG--LNAK[GAL]LYAFEM[FRLK]SCV[DE]KPY
MM_MEPA   : NAMRD--PSSRWKLP-----IPYILADNLE--LNAK[GAL]LHAFEM[FRLK]SCV[DE]KPY
HS_MEPB   : NSIIG--EKYRWPH-----IPYVLEDSLE--MNAK[GVL]LNAFERY[R]LKT[CL]D[F]KPW
MM_MEPB   : NSIIG--DHKRWPH-----IPYVLEDSLE--MNAK[GVL]LNAFERY[R]LKT[CL]D[F]KPW
AC_TBL1   : -ATPAD-RSKLWDHGV-----IPYVIESNYS--GENK[DLF]K[LAM]RH[WEN]L[TC]L[V]KDK
SP_BMPH   : -AVTAR-PERRWTDVA-----IPYEIDGNFT--GSQ[RA]F[KO]AM[RH]WENY[TC]L[F]VER
BR_TLD    : -AATSR-AEKIWPGGV-----IPYVIGGNFT--GSQ[RA]M[FKO]AM[RH]WEK[TC]V[F]IEK
HS_TLD    : -AATSR-TERIWPGGV-----IPYVIGGNFT--GSQ[RA]M[FKO]AM[RH]WEK[TC]V[F]IER
HS_TLD2   : -AATSR-TERIWPGGV-----IPYVIGGNFT--GSQ[RA]M[FKO]AM[RH]WEK[TC]V[F]IER
XL_XOLLOID : -AATSR-TERIWPGGI-----IPYA[IA]GNFT--GTORAI[FKO]AM[RH]WEK[TC]V[F]VER
XL_BMP1   : -ASTSR-PERVWPDGV-----IPYV[IS]GNFS--GSQ[RA]I[FRO]AM[RH]WEK[TC]V[F]LER
HS_BMP1   : -AATSR-PERVWPDGV-----IPFV[IG]GNFT--GSQ[RA]V[FRO]AM[RH]WEK[TC]V[F]LER
MM_BMP1   : -AATSR-PERVWPDGV-----IPFV[IG]GNFT--GSQ[RA]V[FRO]AM[RH]WEK[TC]V[F]LER
DM_TLD    : -AVTVR-KERTWDYGV-----IPYEIDTIFS--GAH[KAL]F[KO]AM[RH]WEN[TC]L[F]VER
DM_TOK    : -AVTAK-KERIWDYGV-----IPYEIDGNFS--GIH[KAL]F[KO]AM[RH]WEN[TC]L[F]VER
PL_BP10   : -ATIIY--ESQRWPKYK-----IPYV[IS]PSSS--GQSS-L[IR]N[AM]D[H]W[E]Q[NT]C[L]R[F]EPR
SP_SPAN   : -ATIIY--ESQRWSYKI-----IPYV[IS]SSSS--GQSS-L[IR]S[AM]D[H]W[E]Q[NT]C[L]R[F]EPL
XL_UVS2   : SAINDA--RFLWPKSADGIVPVPY[IV]S[YSY]N--ADQLAL[FK]KAT[Q]E[E]EAL[TC]V[R]E[V]PW
OL_HCE1   : NAMKCWSSSCFWKKASNGLVVPYV[IS]SEYS--GGEVAT[IE]GAM[RA]E[NGK]T[C]R[F]VRR
AJ_EHE4   : NAMKCWNNQCLWRKSSDGLVEVPY[IV]SNEFS--YYH[KR]I[EN]AM[KT]E[NT]E[TC]R[F]VPR
AJ_EHE7   : NAMKCRNNRCLWKKSSNGLVVPY[IV]SROFS--YYQ[KR]I[V]KAM[KT]E[NT]O[TC]R[F]VPR
CC_Neph1  : NADPCTARRCKWRKSRNGLVVPYK[IS]N[QYS]--PDEI[KV]I[KO]G[L]N[SET]G[IS]C[R]E[V]PH
HV_HMP1   : KGV[VT]---LDRIWPGAQ-----IPYVFDN[NF]D--NRR[RQ]L[V]N[QA]T[SY]N[Q]H[TC]V[R]E[F]APR
FM_Flavast : STIVS-SFIKTWPNATVY-YTL[LS]Q[GS]L[STQ]AYNT[F]L[TN]L[NK]A[FDM]I[S]SK[TS]V[K]F[V]QR

```

Abb. 3.13 N-terminale Aminosäuresequenz des Darmsaft-Astacins von *M. melolontha* und Alignment mit Astacinen anderer Invertebraten und Vertebraten. MM AST=*Melolontha melolontha* Astacin (Insecta); AA AST=*Astacus astacus* Astacin (Crustacea); AA AEA=*Astacus astacus* Astacus Egg Astacin, AEA (Crustacea); HV HMP2 = *Hydra vulgaris* Hydra MetalloProtease 2, HMP2 (Cnidaria); PC PMP1 = *Podocoryne carnea* PodocoryneMetalloProtease 1, PMP1 (Hydrozoa); HS MEPA = *Homo sapiens* Meprin A (Mammalia); MM

MEPA=*Mus musculus* Meprin A (Mammalia); HS MEPB=*Homo sapiens* Meprin B (Mammalia); MM MEPB=*Mus musculus* Meprin B (Mammalia); AC TBL1=*Aplysia californica* TBL1 (Gastropoda); SP BMPH=*Strongylocentrotus purpuratus* BasicMetalloProtease, BMPH (Echinodermata); BR TLD=*Branchiura* spec. Tolloid (Annelida); HS TLL=*Homo sapiens* Tolloid-like 1 (Mammalia); HS TLL2=*Homo sapiens* Tolloid-like 2 (Mammalia); XL XOLLOID=*Xenopus laevis* Xolloid (Amphibia); XL BMP1=*Xenopus laevis* BMP1 (Amphibia); HS BMP1=*Homo sapiens* BMP1 (Mammalia); MM BMP1=*Mus musculus* BMP1 (Mammalia); DM TLD=*Drosophila melanogaster* Tolloid (Insecta); DM TOK=*Drosophila melanogaster* Tolkin (Insecta); PL BP10=*Paracentrotus lividus* Blastula Protease 10 (Echinodermata); SP SPAN=*Strongylocentrotus purpuratus* SpAN (Echinodermata); XL UVS2=*Xenopus laevis* UVS2 (Amphibia); OL HCE1=*Oryzias latipes* High Choriolytic Enzyme 1 (Beloniformes, Osteichthyes); AJ EHE4=*Anguilla japonica* Hatching Enzyme EHE4 (Anguilliformes, Osteichthyes); AJ EHE7=*Anguilla japonica* Hatching Enzyme EHE7 (Anguilliformes, Osteichthyes); CC Nephrosin=*Cyprinus carpio* Nephrosin (Cypriniformes, Osteichthyes); HV HMP1=*Hydra vulgaris* HMP1 (Cnidaria); FM Flavastacin=*Flavobacterium meningosepticum* Flavastacin (Bacteria, CFB-Gruppe). Konservierte, darunter auch isofunktionelle Aminosäurereste sind hervorgehoben.

3.2 Vergleich der Proteasen verschiedener Scarabaeiden-Darmsäfte

Die bislang dargestellten Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf Untersuchungen an Drittlarven des Feldmaikäfers des Standorts Obergrömbach. In diesem Kapitel soll geklärt werden, wie allgemeingültig diese Aussagen sind. Es soll untersucht werden, ob unterschiedliche Populationen und Entwicklungsstadien von *M. melolontha*, sowie nahe verwandte Scarabaeiden-Arten wie die Larven des Waldmaikäfers (*M. hippocastani*) und des Junikäfers (*Amphimallon solstitialis*), ein vergleichbares Protease-Spektrum aufweisen. Dem gleichen Zweck soll zusätzlich noch eine Analyse weiterer Körperflüssigkeiten (Enddarm/Gärsack, Hämolymphe) dienen.

Vergleicht man die caseinolytischen Aktivitäten der Darmsäfte verschiedener Populationen und Entwicklungsstadien von *M. melolontha* wird deutlich, dass es - zumindest bei den hier untersuchten - keine qualitativen Unterschiede in Bezug auf Anzahl und Molekularmassen gibt (Abb. 3.14). Hingegen fällt auf, dass einzelne Aktivitäten unterschiedlich stark ausgeprägt sind - man vergleiche z. B. die drei elastaseartigen Serinproteasen der Drittlarven aus dem Kaiserstuhl mit denen der Käfer. Diese quantitativen Unterschiede werden v. a. im photometrischen Vergleich der chromogenen p-Nitroanilid-Substratreaktionen derselben Ansätze deutlich (Abb. 3.15).

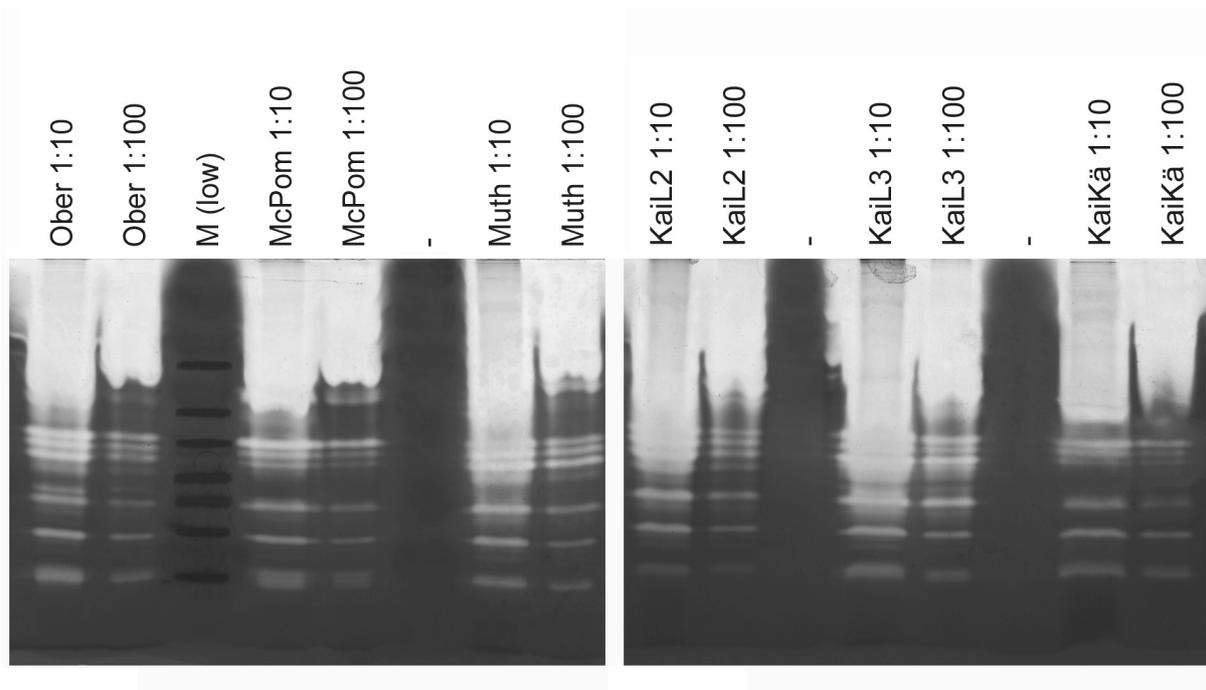


Abb. 3.14 Vergleich der Endoproteasen der Darmsäfte verschiedener *M. melolontha*-Populationen und –Entwicklungsstadien mittels Copolymerisationszymogrammen. Analysiert wurden die Drittlarven der Populationen aus Obergrombach (Ober, Nordbaden), Mecklenburg-Vorpommern (McPom) und Südhessen (Muth), sowie die Zweit- und Drittlarven und Käfer aus dem Kaiserstuhl (KaiL2, KaiL3, KaiKä).

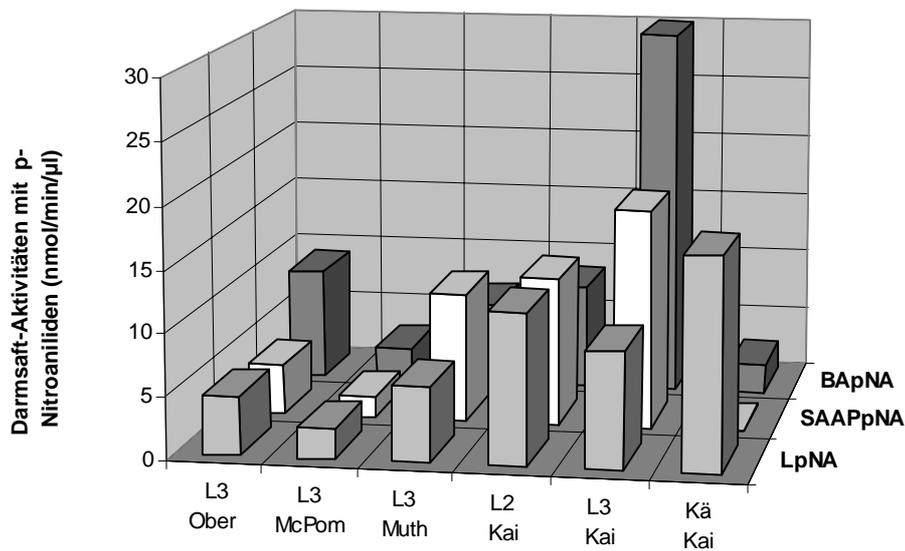


Abb. 3.15 Quantitativer Vergleich der Protease-Aktivitäten der Darmsäfte verschiedener *M. melolontha*-Populationen und –Entwicklungsstadien mittels photometrischer Aktivitätstests mit p-Nitroanilidsubstraten. Analysiert wurden dieselben Ansätze wie in Abb. 3.14 (1:10 Verdünnungen).

Ein Analyse von Larven (*M. melolontha* L3, Obergrombach) in unterschiedlichen Fütterungszuständen, bei der die proteolytischen Aktivitäten von frisch gefütterten mit seit einer Woche hungernden Engerlingen verglichen wurden, zeigte untereinander keine nennenswerte Abweichungen.

Eine Analyse der Darmsäfte anderer Scarabaeidenarten zeigt deutlichere Unterschiede (Abb. 3.16). Zwar können hier die meisten auftretenden Aktivitäten dem Muster bei *M. melolontha* aufgrund ihrer Molekularmassen leicht zugeordnet werden, jedoch konnten verschiedene einzelne Banden nicht nachgewiesen werden. Bei *M. hippocastani* fehlte die untere, bei *A. solstitialis* die mittlere der drei elastaseartigen Aktivitäten. Beiden fehlte zudem die trypsinartige Serinprotease bei 56 kDa; bei *A. solstitialis* konnte zudem die Metalloprotease bei 14 kDa nicht nachgewiesen werden.

Amino-peptidase- und astacinartige Aktivitäten konnten mittels photometrischer und fluorometrischer Tests mit LpNA/Bestatin bzw. DnsPKFAPWV/PLG Hydroxamat bei allen drei Arten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Eine noch detailliertere Analyse eines weiteren Scarabaeiden-Darmsafts folgt im nächsten Kapitel.

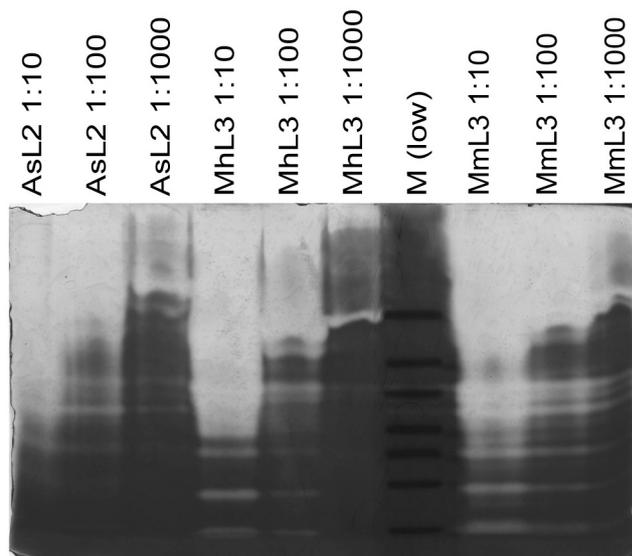


Abb. 3.16 Vergleich der Endoproteasen der Darmsäfte verschiedener Scarabaeiden-Arten mittels Copolymerisationszymogramm. Analysiert wurden Zweitlarven von *A. solstitialis*, Drittlarven von *Melolontha hippocastani* und als Kontrolle Drittlarven von *M. melolontha* (MmL3 der Obergrombach-Population). Siehe hierzu auch die Analyse des Darmsafts von *P. japonica* (Abb. 3.18).

Die freien Endopeptidasen des Enddarms/Gärsacks zeigten mit dem Vorhandensein der Aktivitäten bei 14, 18 und 56 kDa nur eine teilweise Übereinstimmung mit denen des Mitteldarms. Zudem konnten zwei Aktivitäten zwischen 24 und 29 kDa identifiziert werden.

Eine Präparation der Hämolymphe lieferte keinerlei Übereinstimmung mit den bislang charakterisierten Aktivitäten der Darmsäfte. Hier konnte nur die Aktivität einer einzelnen Endopeptidase bei 35 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.17).

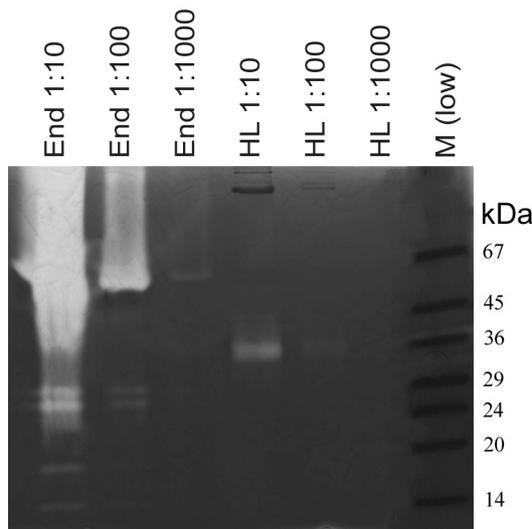


Abb. 3.17 Vergleich der Endopeptidasen verschiedener Körperflüssigkeiten von *M. melolontha* (Drittlarven aus Obergrombach) mittels Zymogramm-Analyse. Analysiert wurde der Enddarmsaft im Bereich der Gärsäcke (End, 16 µg Protein) und die Hämolymphe (HL, 20 µg Protein). Zum Vergleich siehe Analyse des Mitteldarmsafts. (Die Angaben der Proteinmenge/Spur beziehen sich auf 1:10 Verdünnungen.)

3.3 Charakterisierung der Proteasen im Mitteldarm von *P. japonica*

Im Folgenden wurde der Darmsaft des Japankäfers *Popillia japonica* charakterisiert. Es handelte sich hierbei im Gegensatz zu den bislang untersuchten Arten (*M. melolontha*, *M. hippocastani*, *A. solstitialis*) um einen für das Cry8C-Toxin sensitiven Scarabaeiden. Durch den Vergleich mit *M. melolontha* wurden hier die Unterschiede in der Zusammensetzung der Proteasen herausgearbeitet.

Eine Zymogramm-Analyse (Abb. 3.18) zeigte, dass sich Anzahl und Molekularmassen der Aktivitäten im Darmsaft von *P. japonica* deutlich von denen bei *M. melolontha* unterschieden und dass eine gegenseitige Zuordnung allein mit dieser Methode nicht möglich war. Daher wurden auch hier die spezifisch hemmbaren chromogenen p-Nitroanilid-Substratreaktionen in Aktivitätsblots und photometrischen Tests eingesetzt (Abb. 3.19C, Abb. 3.20).

Hierdurch konnte bei 63 kDa eine einzelne trypsinartige Serinprotease nachgewiesen werden, die offenbar einer der drei Aktivitäten beim Maikäfer entspricht. Entsprechende Aktivitäten bei 56 und 18 kDa konnten selbst durch die empfindliche Zymogramm-Technik nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.18). Die photometrisch gemessene BAPNA-Gesamtaktivität erreichte ca. 40 % derer des Maikäfer-Darmsafts.

Des Weiteren wurden zwei elastaseartige Serinproteasen bei 63 und 35 kDa (Abb. 3.19A, B, Abb. 3.21, Abb. 3.22) identifiziert, von denen die letztere nicht eindeutig einer caseinolytischen Aktivität zugeordnet werden konnte, was in diesem Einzelfall auf ein unterschiedliches Laufverhalten bei dieser Technik hindeuten könnte. Möglicherweise handelt es sich bei der gesuchten Aktivität um jene bei 29 kDa (Abb. 3.18, „Pj DS“). Die SAAPpNA-Gesamtaktivität erreichte nur 25 % derjenigen des Maikäfer-Darmsafts, die von STANA jedoch 280 %. Trotz dieser Diskrepanz konnte eine Beteiligung weiterer Protease-Klassen an der STANA-Substratreaktion ausgeschlossen werden (Abb. 3.22).

Chymotrypsinartige Serinproteasen wurden wie bei *M. melolontha* keine gefunden.

Weitere Zymogramm-Aktivitäten konnten bei 20, 39 und 44 kDa identifiziert werden. Bei mindestens einer davon könnte es sich um eine astacinartige Metalloprotease handeln, da solch eine Aktivität in fluorometrischen Tests mit DnsPKFAPWV nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

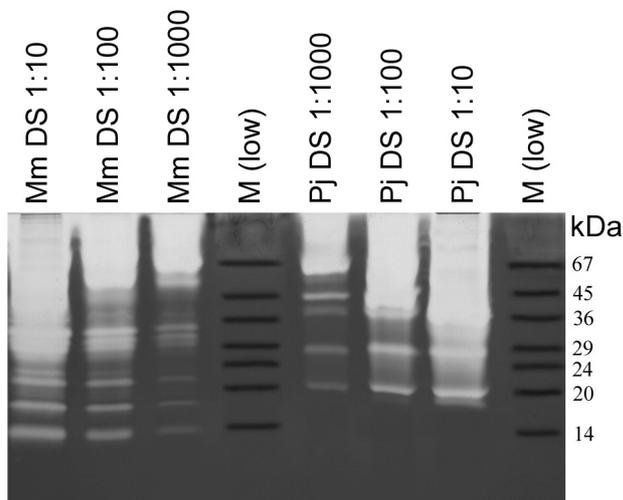


Abb. 3.18 Zymogramm-Analyse der Darmsaft-Endopeptidasen von *P. japonica* (Pj DS) im Vergleich zu *M. melonantha* (Mm DS). Analysiert wurden Pj DS-Verdünnungen von 1:10 bis 1:1000 (= 13 µg – 0,13 µg Protein).

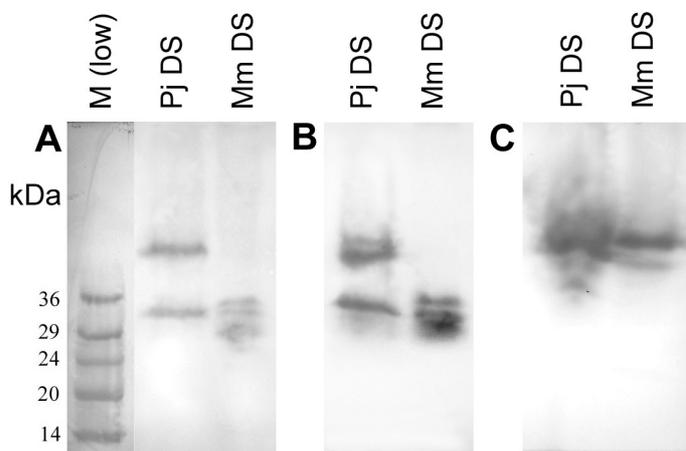


Abb. 3.19 Analyse der Substratspezifität: Aktivitätsblots des Darmsafts von *P. japonica* (Pj DS, 130 µg Protein) im Vergleich zu *M. melonantha* (Mm DS, 140 µg Protein) mit je 0,2 mM SAAPpNA (A), STANA (B) und BApNA (C) als Substrate.

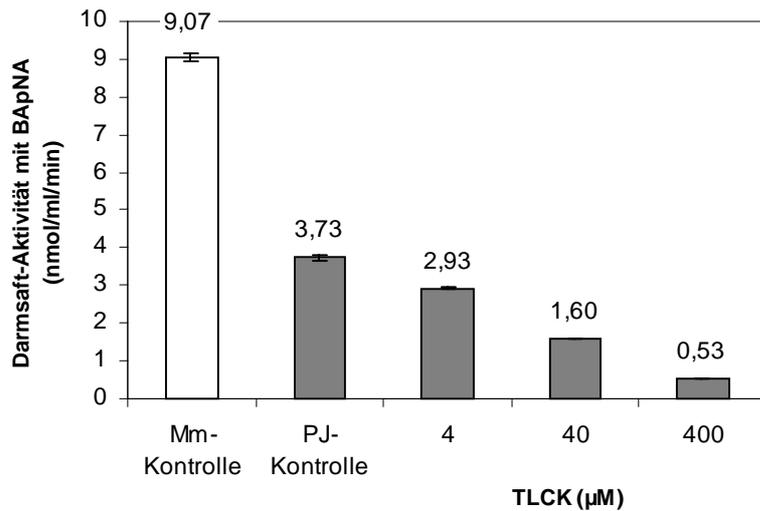


Abb 3.20 Photometrischer Aktivitätstest mit 10 µl 1:10-verdünntem *P. japonica*-Darmsaft (13 µg Protein) und 0,2 mM BApNA als Substrat für trypsinartige Proteasen. Gezeigt ist die Hemmwirkung des trypsin-spezifischen Inhibitors TLCK. Zum Vergleich ist die Aktivität des 1:10-verd. *M. melonantha*-DS aus Abb. 3.2 angegeben.

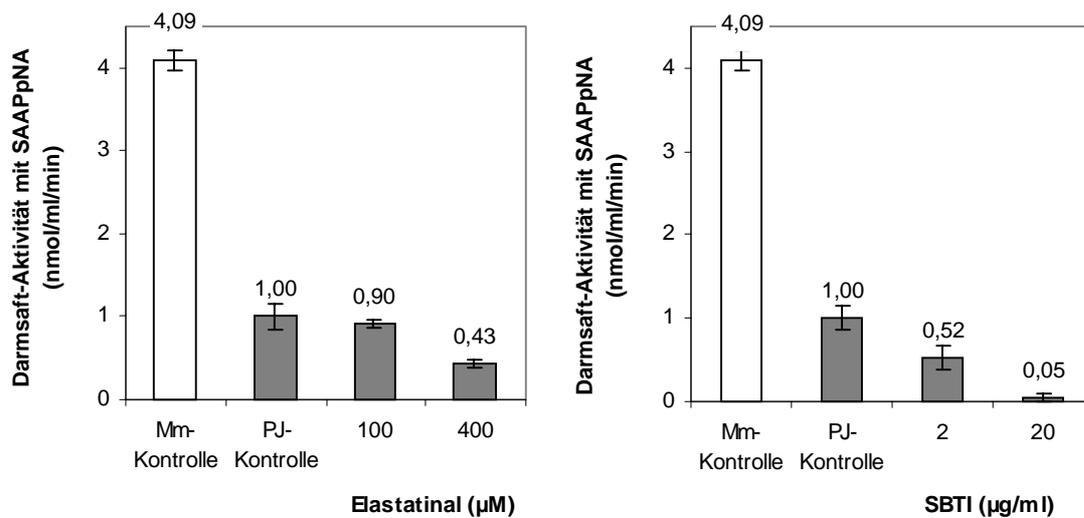


Abb. 3.21 Photometrischer Aktivitätstest mit 10 µl 1:10-verdünntem *P. japonica*-Darmsaft und 0,2 mM SAAPpNA als Substrat für elastaseartige Serinproteasen. Gezeigt sind die Hemmwirkungen des elastasespezifischen Inhibitors Elastatinal und des Serinprotease-spezifischen SBTI. Zum Vergleich ist die entsprechende Aktivität des 1:10-verdünnten *M. melonantha*-DS aus Abb. 3.4 angegeben.

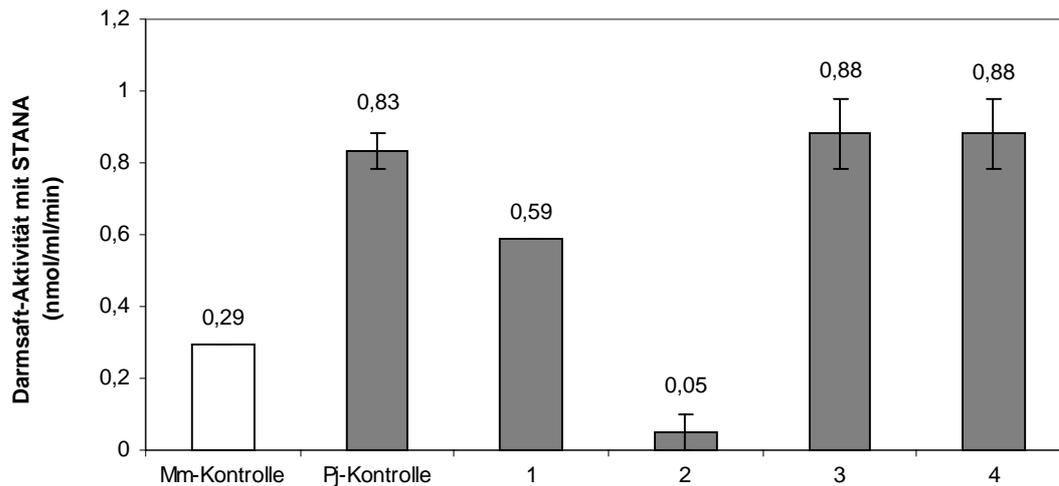


Abb. 3.22 Photometrischer Aktivitätstest mit 10 μ l 1:10-verdünntem *P. japonica*-Darmsaft und 0,2 mM STANA als Substrat. Gezeigt sind die Hemmwirkungen des Astacin-Inhibitors PLG Hydroxamat (1, 2 mM), des elastasespezifischen Inhibitors Elastatinal (2, 200 μ M), des trypsinspezifischen Inhibitors TLCK (3, 400 μ M) und des Metalloproteasen-Hemmers Phosphoramidon (4, 400 μ M). Zum Vergleich ist die Aktivität des 1:10-verdünnten *M. melolontha*-DS (ohne entsprechende vorherige Abbildung) angegeben.

Wie bei *M. melolontha* kommen bei *P. japonica* eine freie und eine membranständige Aminopeptidase nebeneinander vor (Abb. 3.23). Mit ca. 66 kDa haben beide Typen wiederum dieselbe Molekularmasse. Dieses unterscheidet sich allerdings im Vergleich der Arten, da die entsprechenden Aktivitäten von *M. melolontha* bei 85 kDa liegen. Ein weiterer Unterschied besteht in der Aktivität der freien Aminopeptidase, die bei *P. japonica* um Faktor 3 höher liegt (Abb. 3.24).

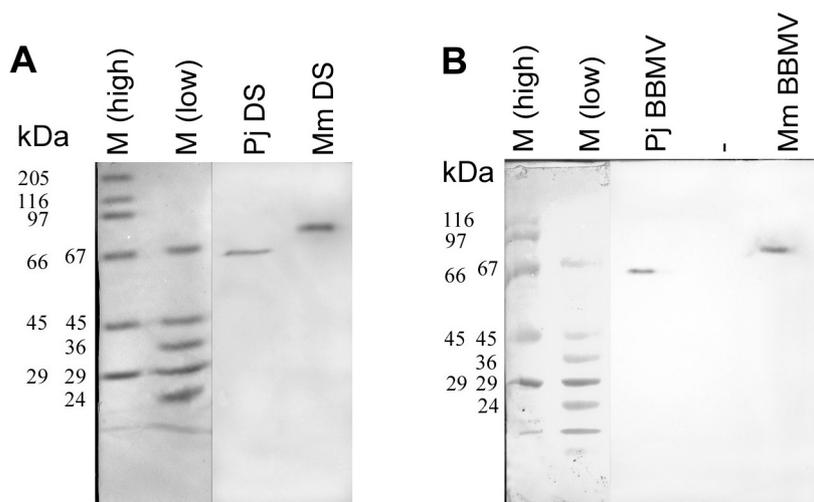


Abb. 3.23 Analyse der (A) freien und der (B) membranständigen Aminopeptidasen-Aktivitäten von *P. japonica* (Pj DS mit 130 μ g Protein; Pj BBMV mit 12 μ g Protein) im Vergleich zu *M. melolontha* (Mm DS mit 140 μ g Protein; Mm BBMV mit 12 μ g Protein) durch Aktivitätsblots mit 0,2 mM LpNA als Substrat. Vergleiche auch mit Abb. 3.10B.

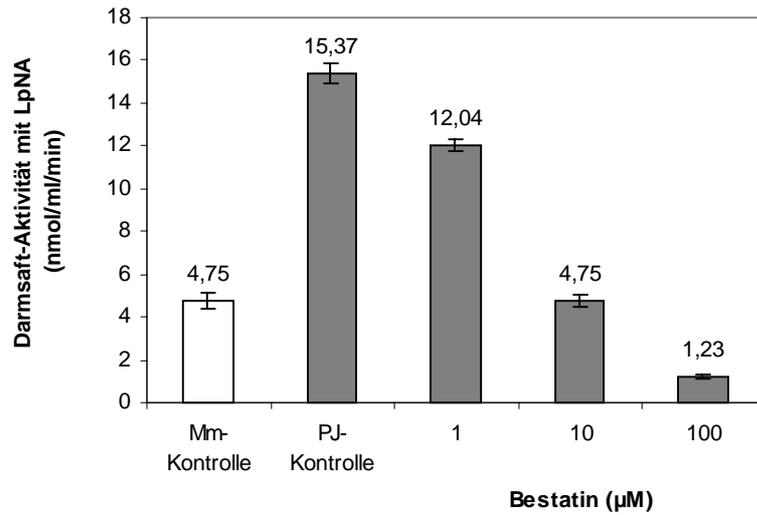


Abb. 3.24 Photometrischer Aktivitätstest mit 10 µl 1:10-verdünntem *P. japonica*-Darmsaft und 0,2 mM LpNA als Substrat für Aminopeptidasen. Gezeigt ist die konzentrationsabhängige Hemmwirkung des Aminopeptidasen-Inhibitors Bestatin. Zum Vergleich ist die entsprechende Aktivität des 1:10-verdünnten *M. melolontha*-DS aus Abb. 3.8 angegeben.

3.4 Redoxpotential

3.4.1 Redoxpotentialmessungen bei *M. melolontha* und *P. japonica*

Die hier beschriebenen Redoxpotential-Untersuchungen wurden notwendig, weil das Vorhandensein reduzierender Bedingungen als eine (von drei) entscheidende Ursache für die proteolytische Inaktivierung des Cry8C-Toxins von *Bacillus thuringiensis japonensis* im Maikäfer identifiziert werden konnte (Kapitel 3.6.5). Da eine solche Inaktivierung im Darmsaft des BTJ-sensitiven Scarabaeiden *P. japonica* nicht zu beobachten war, bestand der Verdacht, dass sich die Redoxpotentiale der Darmsäfte beider Arten unterscheiden. Diese These sollte durch die folgenden Untersuchungen überprüft werden.

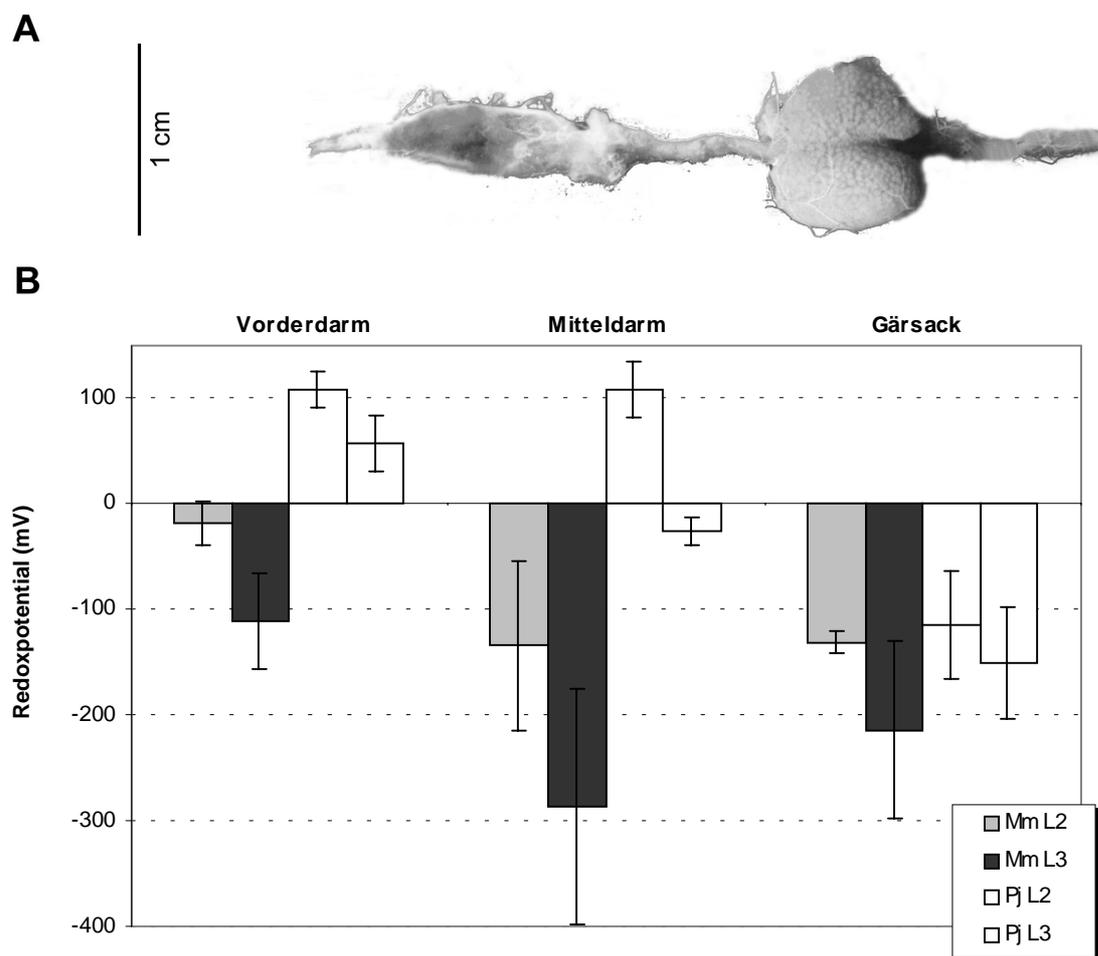


Abb. 3.25 (A) Freipräparierte Darmabschnitte von *M. melolontha* (L3): V. l. n. r. zu erkennen sind der kurze englumige Vorderdarm, der weitleumige Mitteldarm, an dessen Ende eine kranzförmige Anordnung von Malpighi-Gefäße münden, sowie der lange englumige Enddarm mit gegliedertem Gärsack. Die Oberfläche ist mit einem feinen Netz aus Tracheen bedeckt. (B) Analyse der Redoxpotentiale einzelner Darmabschnitte von Zweit- und Drittlarven von *M. melolontha* (Mm L2, Mm L3) und *P. japonica* (Pj L2, Pj L3). Auf die Darstellung der Enddarmpotentiale wurde verzichtet, da aufgrund des geringen Darmquerschnitts keine eindeutigen Messungen möglich waren.

Die Messungen der Redoxpotentiale wurden sowohl *in vitro* (Abb. 3.26) als auch *in situ* an freipräparierten Darmabschnitten (Abb. 3.25A) mit einer Mikroelektrode durchgeführt und führten zu folgenden Ergebnissen und Tendenzen (Abb. 3.25B):

1. Abgesehen von den Zweitlarven von *P. japonica* lagen die Redoxpotentiale der Mitteldärme aller untersuchten Arten und Larvenstadien niedriger als in den dazugehörigen Vorderdärmen.
2. Die Gärsäcke aller Stadien beherbergten durchweg ein stark reduzierendes Milieu, da alle Messwerte unterhalb von -100 mV lagen. Dieses Niveau wurde in den vorderen beiden Darmabschnitten nur bei *M. melolontha* erreicht, während bei *P. japonica* – und hier insbesondere bei Zweitlarven – eher oxidierende Bedingungen herrschten.
3. Alle entsprechenden Darmabschnitte desselben Larvenstadiums besaßen bei *M. melolontha* ein niedrigeres Redoxpotential als bei *P. japonica*. Besonders drastische Unterschiede wurden in Vorder- und Mitteldarm, während die reduzierenden Bedingungen der jeweiligen Gärsäcke fast ähnliche Niveaus erreichten.
4. Bei Drittlarven herrschten in jeweils allen untersuchten Darmabschnitten reduzierendere Bedingungen als bei den Zweitlarven derselben Art. Auch hier bestanden die größten Messwert-Differenzen innerhalb der Vorder- und Mitteldärme.

Um zu klären, ob das Zustandekommen des Redoxpotentials auf externe Faktoren zurückzuführen ist, wurden Gruppen von Engerlingen verglichen, die mit Graswurzeln, Möhren oder gar nicht gefüttert worden waren. Dabei zeigte sich, dass unterschiedliche Nahrung bzw. Fütterungszustände keine unterschiedlichen Auswirkungen auf das Redoxpotential einzelner Darmabschnitte *in situ* hatten.

Ein Vergleich der Messwerte zwischen den Untersuchungen *in situ* und *in vitro* zeigte, dass das Redoxpotential unmittelbar innerhalb einer Minute sprunghaft anstieg, sobald der Darmsaft aus dem Tierkörper extrahiert worden war und mit Luftsauerstoff in Berührung kam (Abb. 3.26, Balken 3 u. 4). Hierdurch wurde ein konstantes Niveau erreicht (ca. $+200$ mV). Weiter wurde beobachtet, dass sich dieser oxidierte Darmsaft bei zunehmend starker Verdünnung immer mehr dem Potential von dH_2O (ca. $+460$ mV) annähert (Balken 4-8).

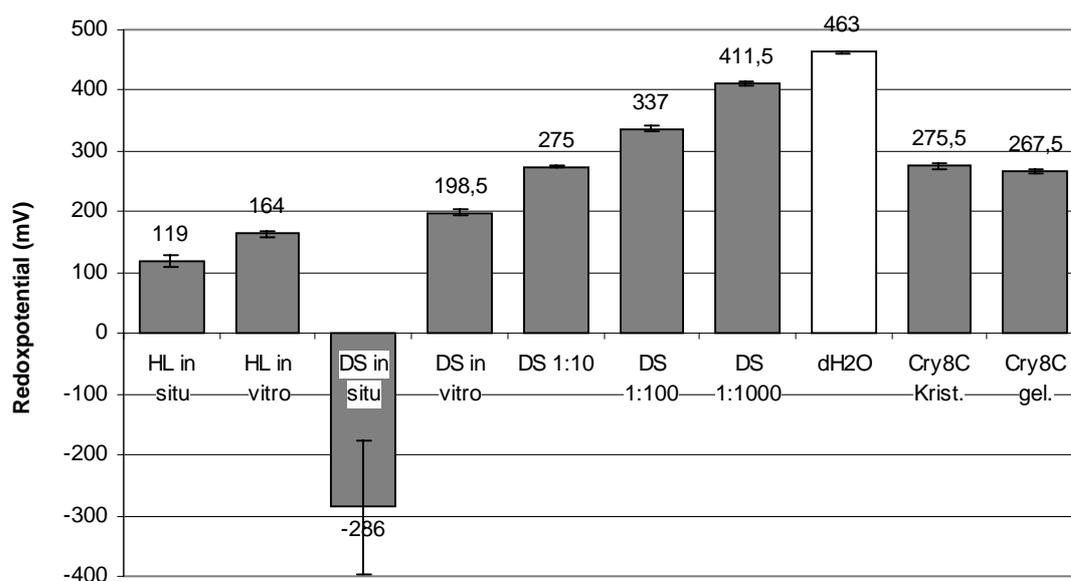


Abb. 3.26 Redoxpotentiale weiterer in dieser Arbeit verwendeter Ansätze. Analysiert wurden die Hämolymphe (HL) und der Darmsaft (DS) von *M. melolontha*, destilliertes Wasser (dH_2O), das zur Verdünnung des DS diente, sowie eine präparierte Suspension aus BTJ-Toxinkristallen (Cry8C Krist.) und das gelöste 65 kDa Toxin (Cry8C gel.).

Das Redoxpotential der Hämolymphe wurde ebenfalls untersucht und diente als Kontrolle für ein Kompartiment mit oxidativen Bedingungen. Der hohe Messwert in situ (ca. + 120 mV) spiegelte dabei die reiche Versorgung mit den O₂-haltigen Tracheen und den Mangel an mikrobieller Respiration (siehe Diskussion) wieder. Ein direkter Kontakt mit dem Luftsauerstoff führte im Gegensatz zum Darmsaft nur zu einem geringfügigen weiteren Anstieg auf ca. + 160 mV (Abb. 3.26).

Die in dieser Abbildung zusätzlich aufgeführten Messwerte von Kristall- und Toxinpräparationen dienen zur Charakterisierung der in Kap. 3.6 eingesetzten Ansätze.

3.4.2 Phenoloxidase-Aktivitätsmessungen

Das Ziel des folgenden Versuches bestand darin, die mögliche Existenz von Phenoloxidasen im Darmsaft nachzuweisen. Diese Enzyme, die im Immunsystem der Insekten an der Melanisierung und Immobilisierung von Pathogenen in der Hämolymphe beteiligt sind, stehen im Verdacht, auch an der Ausbildung der Redoxpotentiale bei Darmsäften beteiligt zu sein. Da Phenoloxidasen zudem die Bildung weiterer chromogener Chinone katalysieren, wird vermutet, dass hierdurch die Braunfärbung der Darmsäfte zustande kommt.

Als diagnostisches System wurde eine photometrisch messbare Farbreaktion gewählt, bei der eine potentielle Phenoloxidase unter oxidativen Bedingungen Dopamin zum chromogenen Dopaminchinon umsetzt.

Erwartungsgemäß führte der Einsatz von Hämolymphe zu einer heftigen Farbreaktion (Abb. 3.27). Verglichen mit dieser Positivkontrolle zeigten die Darmsäfte der hier untersuchten Scarabaeiden allerdings weniger als 1 % Aktivität.

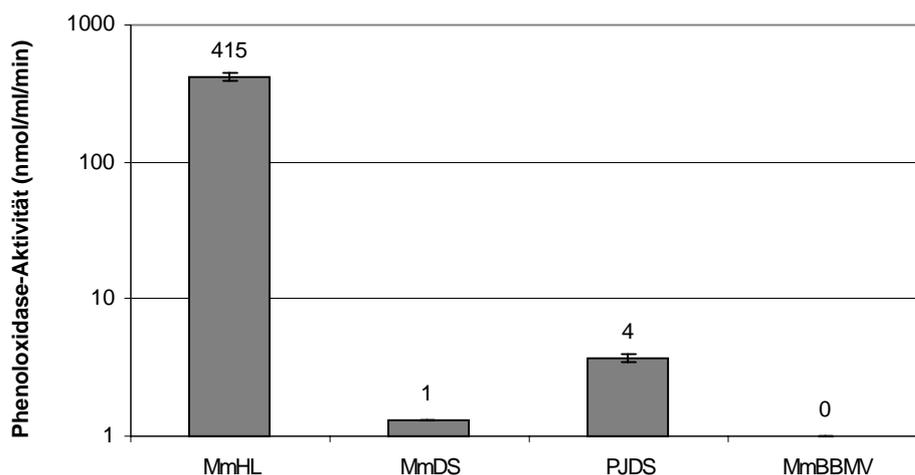


Abb. 3.27 Photometrische Analyse der Phenoloxidase-Aktivität im Darmsaft von *M. melolontha* und *P. japonica*, sowie der Hämolymphe und den BBMVs des Mitteldarm-Epithels von *M. melolontha* durch die enzymatisch gesteuerte Oxidation von Dopamin zum chromogenen Dopaminchinon.

3.4.3 Künstliche Erzeugung der reduzierenden Bedingungen

Mit der folgenden Untersuchung sollte gezeigt werden, inwieweit es möglich ist, die unterschiedlichen Redoxpotentiale der beiden Scarabaeiden-Darmsäfte zu simulieren und somit ein System zu entwickeln, in dem es in vitro möglich ist, den Toxinabbau (Kap. 3.6) unter ähnlichen Bedingungen durchzuführen. Als reduzierendes Agens wurde DTT, und als Kontrolle das ebenfalls in jenen Untersuchungen eingesetzte chaotrope Salz Na_2CO_3 gewählt.

Abb. 3.28 zeigt die Ergebnisse. Ein Vergleich mit Abb. 3.25 verdeutlicht, dass eine DTT-Konzentration von maximal 5 mM ungefähr das Redoxpotential des *P. japonica*-Darmsafts (L3) erreicht (ca. -30 mV). Eine Konzentration von mindestens 250 mM DTT liegt im Bereich des *M. melolontha*-Darmsafts (L2, ca. -140 mV).

Im Gegensatz zum Darmsaft blieben die Reaktionsansätze nach Kontakt mit Luftsauerstoff mindestens zwei Stunden stabil. Die Inkubationsdauer aller proteolytischen Versuche in Kap. 3.6.5 überschreitet diese Zeit nicht.

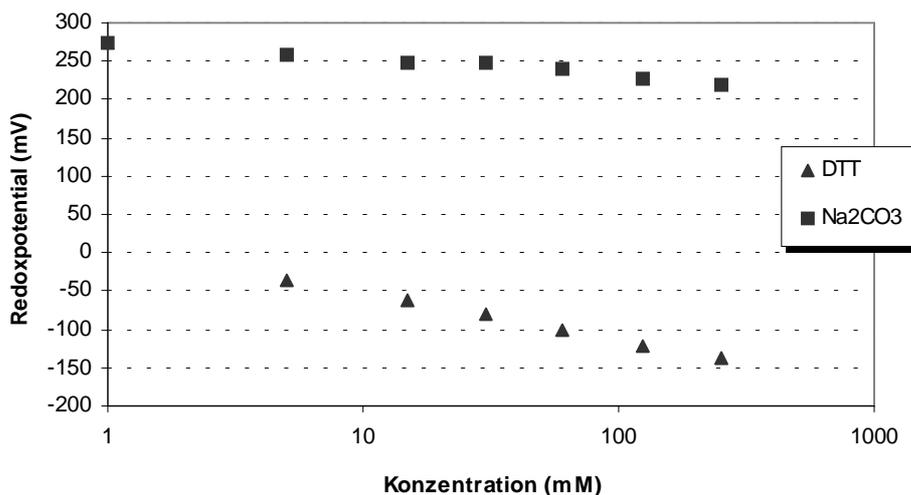


Abb. 3.28 Konzentrationsabhängigkeit des Redoxpotentials bei Verwendung des reduzierenden Agens Dithiothreitol (DTT) und des chaotropen Agens Natriumcarbonat (Na_2CO_3). Analysiert wurden die Konzentrationen 0, 5, 15, 30, 60, 125 und 250 mM.

3.5 Die endogene Protease von BTJ

Wie sich in Kapitel 3.6 zeigen wird, spielen bei der Aktivierung des 130 kDa Protoxins von BTJ nicht nur die (exogenen) Darmproteasen des Insekts eine Rolle, sondern auch die des Bakteriums selbst. Daher wurde es notwendig, alle sog. endogenen Proteasen von BTJ zu bestimmen und näher zu charakterisieren.

Untersucht wurde das Vorkommen von Proteasen in verschiedenen Stadien der Bakterienentwicklung, nämlich von der exponentiellen Wachstumsphase bis hin zur Autolyse des Sporangiums. Bei den vegetativen Stadien wurde zudem zwischen ins Medium sezernierten und intrazellulären Proteasen unterschieden.

Bei dieser differenzierten Untersuchung wurde eine einzelne Metalloprotease bei 85 kDa identifiziert (Abb 3.29), die bei allen untersuchten Stadien nachgewiesen werden konnte. Diese spaltete die chromogenen Substrate SAAPLpNA und SAAPpNA und konnte durch die Metalloprotease-Inhibitoren 1,10-Phenanthrolin und Phosphoramidon weitgehend gehemmt werden. Inhibitoren anderer Proteaseklassen zeigten keinen Effekt. Weitere Tests, insbesondere zum Nachweis einer Aminopeptidase durch LpNA, führten nicht zur Identifikation weiterer Proteasen.

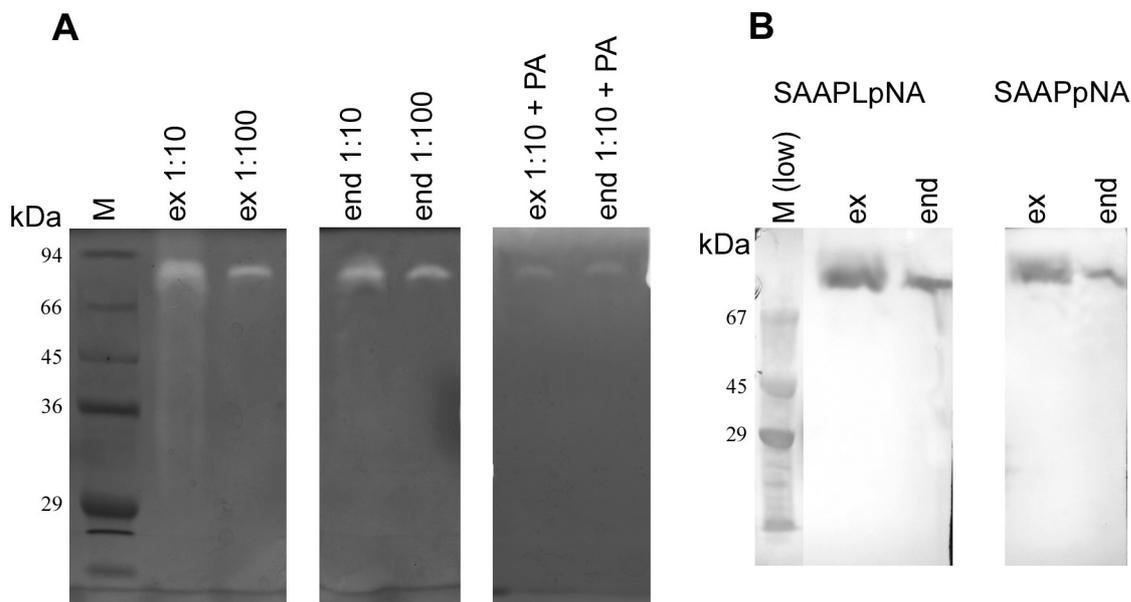


Abb. 3.29 Darstellung der endogenen Protease von *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui. Ausgehend von einer Flüssigkultur (log-Phase) wurden extra- (ex) und intrabakterielle (end) Bestandteile gemäß Reddy (1997) präpariert und analysiert. (A) 12 %iges Diffusionszymogramm von 1:10 und 1:100-verdünnten Präparationen (0,3 μ g bzw. 0,03 μ g Protein); Hemmung der caseinolytischen Aktivität mit 0,8 mM Phosphoramidon (PA); (B) Aktivitätsblots der Präparationen (3 μ g Protein) nach 15 %iger SDS-PAGE mit 0,2 mM SAAPLpNA bzw. SAAPpNA als chromogene Substrate.

Auch in den parasporalen Kristallpräparationen wurde diese endogene Protease nachgewiesen (Abb. 3.30). Diese ist offenbar eng mit den Kristallen assoziiert, da diese bei der durchgeführten Gleichgewichtszentrifugation und den Waschschrritten (s. Kap. 2.1.3) nicht abgetrennt werden konnte. Dies konnte erst durch einen weiteren Reinigungsschritt, einer DMAE-Anionenaustauschchromatographie (siehe Kap. 2.1.4), erreicht werden. Das so aufgereinigte Toxin kam – wenn nicht anders angegeben – in den folgenden Kapiteln zum Einsatz.

Eine Hemmung der Aktivität mit Phosphoramidon war auch bei den Kristallsuspensionen und den Präparationen des gelösten Toxins erfolgreich (Abb. 3.30). Aufgrund der niedrigeren Aktivität wurden die Untersuchungen hier mit den sensitiveren Copolymerisationszymogrammen durchgeführt. Dies erklärt im Gegensatz zu Abb. 3.29A die Schmierbildung im oberen Bereich, die durch Proteolyse während der Elektrophorese entstand (s. Kap. 2.3.5).

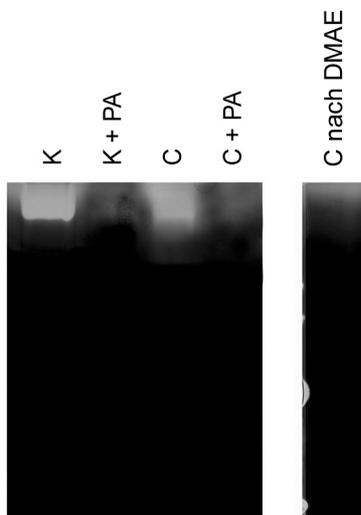


Abb. 3.30 Analyse der endogenen Aktivität, die eng mit den Kristallen assoziiert waren (12 %iges Copolymerisationszymogramm). Analysiert wurden die Kristallsuspension (K, 7 μ g Protein) und das hieraus gelöste und konzentrierte Toxin (C, 7 μ g Protein; siehe auch Kap. 3.6.2), sowie das gereinigte Toxin nach DMAE-Anionenaustauschchromatographie. Die Hemmung der Aktivität erfolgte mit 0,8 mM Phosphoramidon (PA).

3.6 Prozessierung von Cry8C

In diesem Abschnitt wurden die Prozesse untersucht, die zum proteolytischen Abbau und somit zur Aktivierung und Inaktivierung des Kristalltoxins von *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui führen. Dabei wurde der Einfluss bekannter physiologischer Faktoren wie der des Redoxpotentials oder das Vorkommen von Biotensiden besonders berücksichtigt. Die Beteiligung einzelner Proteasen wurde bei verschiedenen Abbaustufen des Toxins durch Verwendung von Inhibitoren oder isolierter Einzelaktivitäten bzw. –Gruppen analysiert.

Mit Kap. 3.6.1 wurde den eigentlichen Untersuchungen zum Toxinabbau ein Kapitel vorangestellt, das hierfür die Bereitstellung von einzelnen Proteasen bzw. –Gruppen des Darmsafts von *M. melolontha* erläutert.

3.6.1 Isolierung einzelner Proteasen bzw. –Gruppen des Darmsafts

Die Aktivitäten des Darmsafts von *M. melolontha* wurden zunächst durch eine sukzessive Ammoniumsulfat-Fällung aufgetrennt (Abb. 3.31). Keine der Proteasen verlor durch diese Behandlung feststellbar an Aktivität. Durch die unterschiedlichen Fällungseigenschaften der Proteine wurde es möglich, einige Aktivitäten in bestimmten Fraktionen anzureichern und von anderen teilweise abzutrennen. Am deutlichsten wurde dies bei der 14 kDa Metalloprotease, die bei >40 % optimal gefällt wird, während die restlichen Proteasen zwischen 20 – 30 % Salz ausfielen.

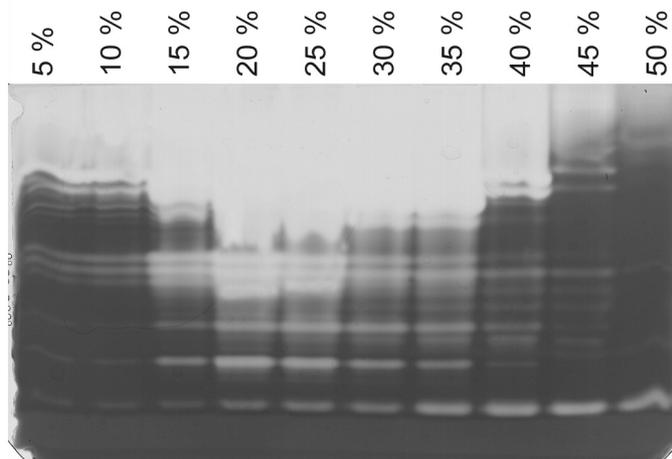


Abb. 3.31 Sukzessive Ammoniumsulfatfällung des Darmsafts von *M. melolontha*. Die Analyse erfolgte durch ein Copolymerisationszymogramm. Den aufgetragenen Fraktionen entsprechen folgende Proteinmengen: 1,4 µg (5 %); 1,1 µg (10 %); 2,6 µg (15 %); 12,4 µg (20 %); 10,9 µg (25 %); 7,2 µg (30 %); 6,8 µg (35 %); 4,4 µg (40 %); 2,6 µg (45 %); 1,9 µg (50 %);

Hiervon ausgehend wurden die entsprechenden Fraktionen gepoolt, das Salz mittels Dialyse entfernt, und als Proben für Anionenaustauschchromatographien mit Fraktogel EMD DMAE eingesetzt (Abb. 3.32 – 3.34).

Hierdurch war es möglich, die Metalloprotease bei 14 kDa (= M14), die Protease(n) >100 kDa (= P100), sowie die anionischen trypsinartigen Serinproteasen bei 56 und 63 kDa

(= DMAE-Durchlaufraction D1) isoliert darzustellen. Hinzu kamen Mischfraktionen, bei denen einzelne Proteasen dominierten, aber nicht vollständig frei von anderen Restaktivitäten waren. Dies war bei einzelnen DMAE-Elutionsfraktionen, sowie bei der Astacin-haltigen Mischfraktion M23, die nach PLG-Affinitätschromatographie gewonnen wurde (Abb. 3.12), der Fall.

Da die Proteasen bereits durch niedrige Salzkonzentrationen eluiert werden konnten ($<0,4$ M NaCl), wurde bei den für die proteolytischen Tests mit Cry8C verwendeten Fraktionen auf eine weitere Dialyse verzichtet.

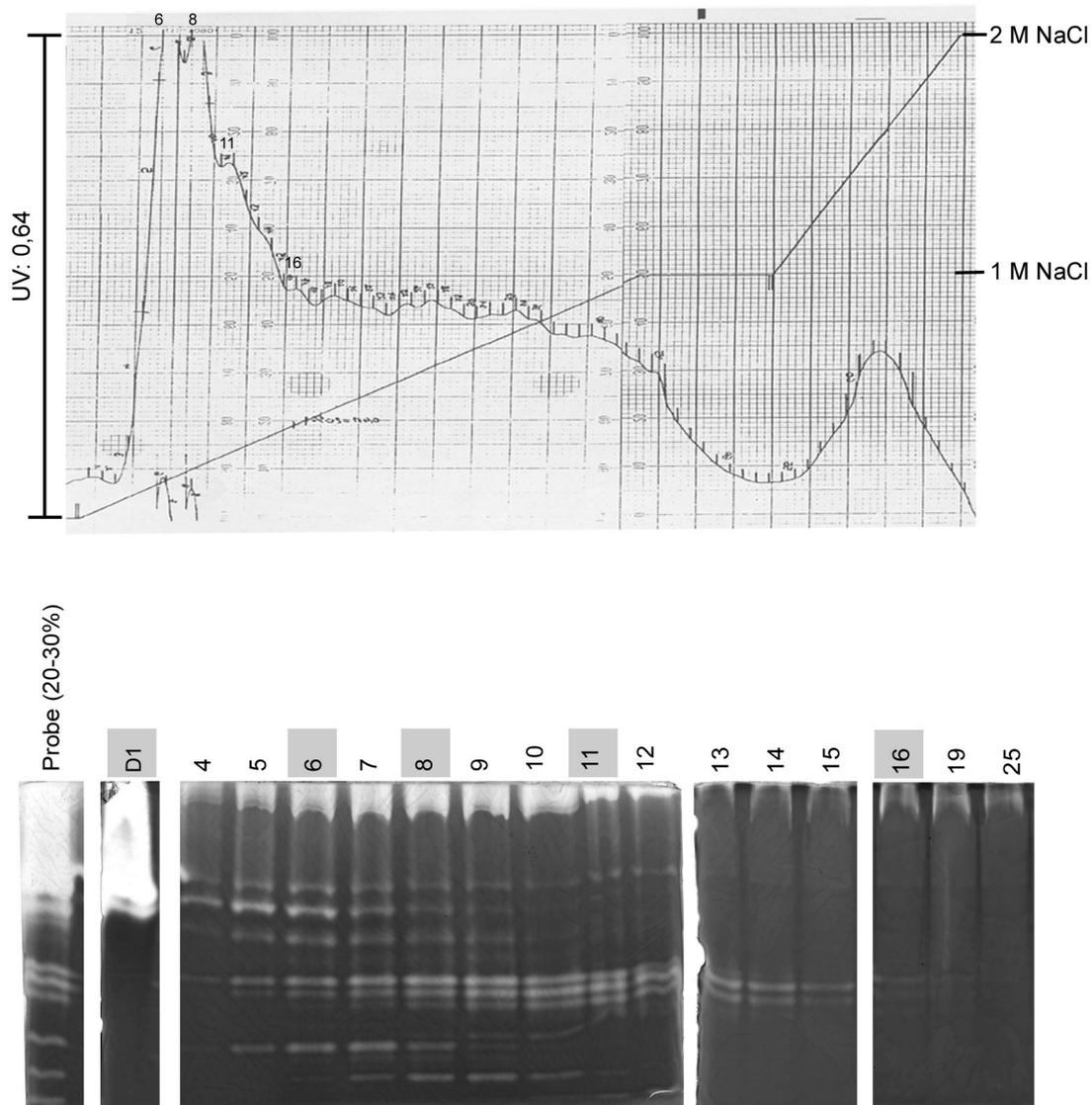


Abb. 3.32 Auftrennung der Darmproteasen mittels DMAE-Anionenaustauschchromatographie (Lauf 1): Elutionsprofil und Analyse der chromatographischen Trennergebnisse durch Copolymerisationszymogramme. Eine mit 20-30 % Ammoniumsulfat gefällte Fraktion (s. Abb. 3.31) wurde zur Entfernung des Salzes gegen den Startpuffer dieses Laufs (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM CaCl_2) dialysiert. Nicht an das Säulenmaterial bindende Proteasen wurden als Durchlaufraction D1 aufgefangen. Die Elution gebundener Proteasen erfolgte durch einen kontinuierlichen Salzgradienten (0-1 M NaCl für 45 min; 10 min bei 1 M NaCl; 1-2 M NaCl für 15 min). Fraktionen, die für proteolytische Untersuchungen mit Cry8C eingesetzt wurden (Kap. 3.6.6), sind grau gekennzeichnet (D1, Fraktionen Nr. 6, 8, 11 und 16).

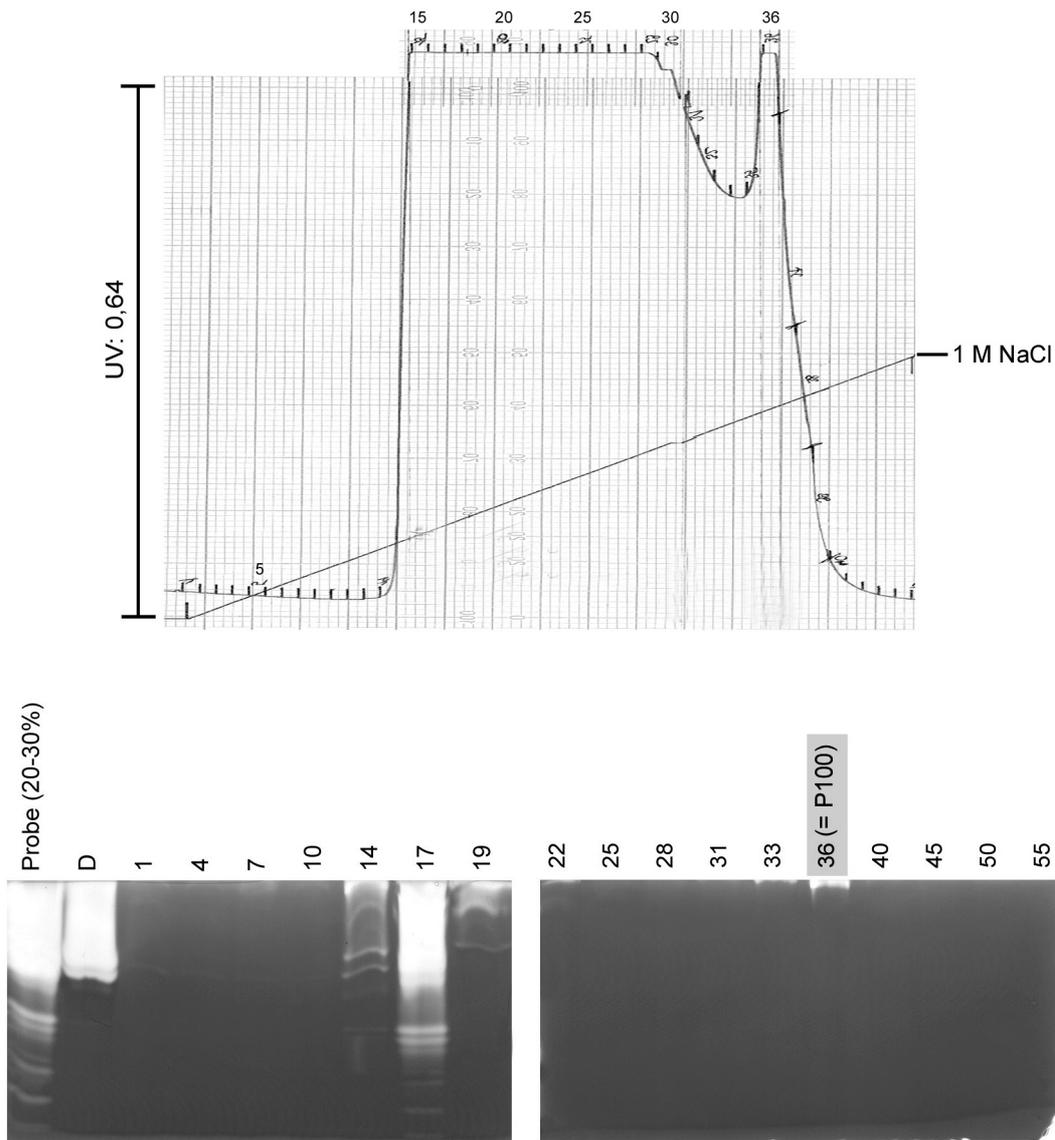


Abb. 3.33 Auftrennung der Darmproteasen mittels DMAE-Anionenaustauschchromatographie (Lauf 2): Elutionsprofil und Analyse der chromatographischen Trennergebnisse durch Copolymerisationszymogramme. Eine mit 20-30 % Ammoniumsulfat gefällte Fraktion wurde zur Entfernung des Salzes gegen den Startpuffer dieses Laufs (50 mM Tris/HCl pH 6,0, 5 mM CaCl_2) dialysiert. Nicht an das Säulenmaterial bindende Proteasen wurden als Durchlaufraction D aufgefangen. Die Elution gebundener Proteasen erfolgte durch einen kontinuierlichen Salzgradienten (0-1 M NaCl für 45 min). Fraktion 36, die ausschließlich die Aktivität >100 kDa enthielt, wurde bei den proteolytischen Untersuchungen mit Cry8C eingesetzt.

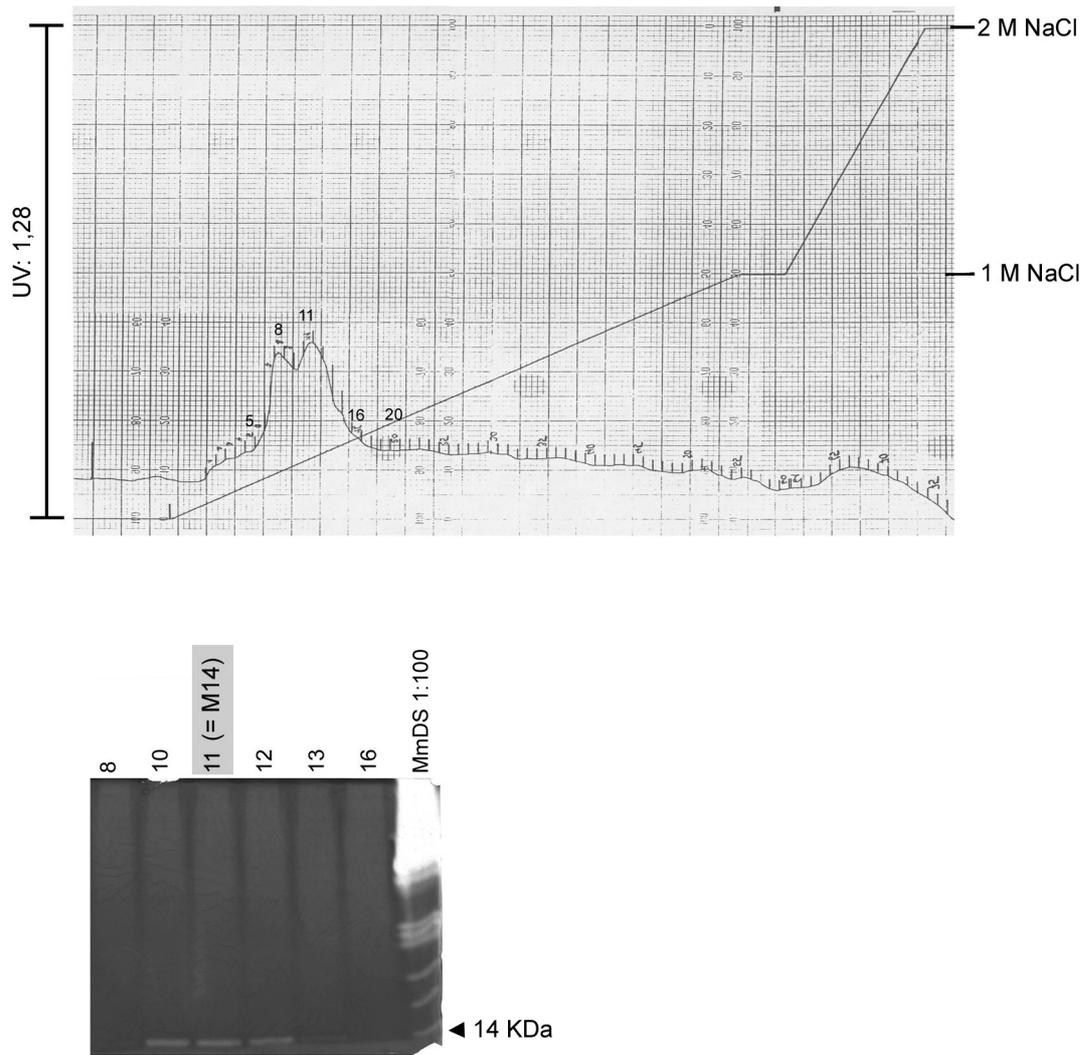


Abb. 3.34 Auftrennung der Darmproteasen mittels DMAE-Anionenaustauschromatographie (Lauf 3): Elutionsprofil und Analyse der chromatographischen Trennergebnisse durch ein Copolymerisationszymogramm. Eine mit 40-50 % Ammoniumsulfat gefällte Fraktion wurde zur Entfernung des Salzes gegen den Startpuffer dieses Laufs (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM CaCl_2) dialysiert. Die Elution gebundener Proteasen erfolgte durch einen kontinuierlichen Salzgradienten (0-1 M NaCl für 60 min; 5 min bei 1 M NaCl; 1-2 M NaCl für 15 min). Fraktion 11, die ausschließlich die Aktivität bei 14 kDa enthielt, wurde bei den proteolytischen Untersuchungen mit Cry8C eingesetzt.

3.6.2 Lösen der Toxinkristalle und proteolytische Aktivierung zu 65 kDa

Die parasporalen Proteinkristalle von *Bacillus thuringiensis* werden im Darmsystem von Zielinsekten gelöst und die freiwerdenden Protoxine proteolytisch aktiviert. Bedingt durch die biochemische Struktur der Kristalle kann der Lösungsvorgang in einem stark alkalischen Milieu, etwa im Mitteldarm von Lepidopteren, erfolgen. Da hingegen die Scarabaeiden-Darmsäfte nur pH-Werte um 8,0 aufweisen, müssen für realitätsnahe Untersuchungen weitere Lösungsmechanismen in Betracht gezogen werden. Hierbei kommen Biotenside, chaotrope, sowie die in Kap. 3.4 nachgewiesenen reduzierenden Bedingungen in Frage. Die bei der Simulation solcher Bedingungen auftretenden proteolytischen Prozesse wurden hier analysiert.

Abb. 3.35 zeigt die konzentrationsabhängige Effizienz beim Lösungsvorgang des Kristalls von BTJ unter reduzierend-chaotropen Bedingungen. Mit steigender DTT-Konzentration erhöhte sich auch die Löslichkeit. Bei Verwendung von 250 mM Na_2CO_3 pH 8,0, 250 mM DTT konnten die Kristalle zu ca. 80 % gelöst werden. Diese Bedingungen wurden zur Bereitstellung des gelösten Toxins für Untersuchungen in den folgenden Kapiteln übernommen (siehe auch Material und Methoden).

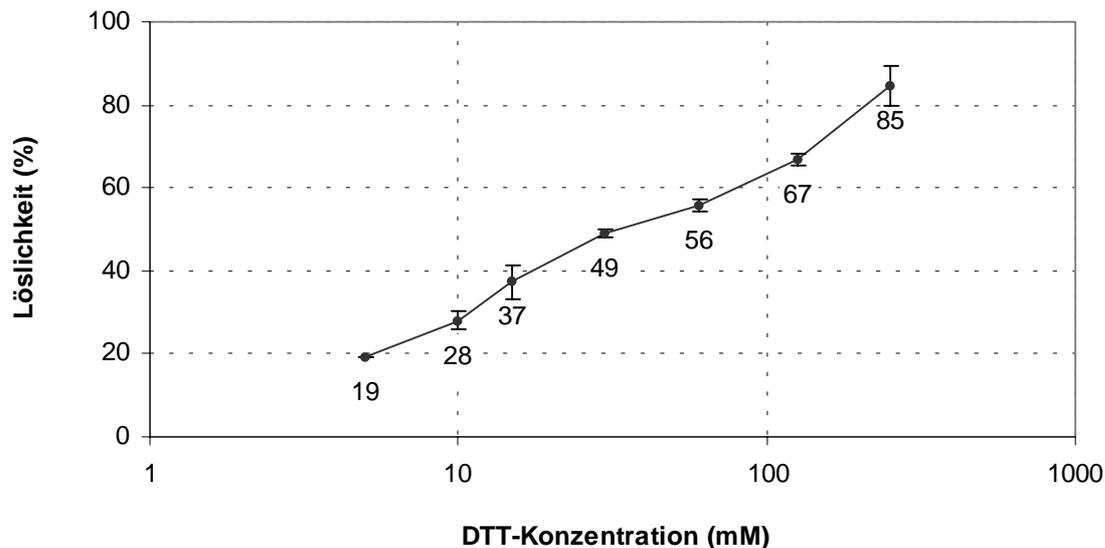


Abb. 3.35 Abhängigkeit der Löslichkeit des BTJ-Kristalls von der DTT-Konzentration. 5 %ige Kristallsuspensionen wurden mit 250 mM Na_2CO_3 und 5 - 250 mM DTT für 90 min gelöst und danach die Proteinkonzentration des Überstands bestimmt. Als Referenz wurden Kristalle unter denaturierenden Bedingungen in 1 M NaOH vollständig gelöst (= 100 %).

Eine Analyse mittels SDS-PAGE zeigte, dass bei diesem Vorgang das 130 kDa Protoxin nicht erhalten blieb, sondern zu 65 kDa prozessiert wurde (Abb. 3.36A). Durch Biotests konnte nachgewiesen werden, dass es sich dabei um das aktive Toxin handelte (Kap. 3.7.1). Der Prozessierungsschritt konnte auf die Präsenz der eng mit dem Kristall assoziierten endogenen Protease von BTJ (Kap. 3.5) zurückgeführt werden. Dieser konnte durch Phosphoramidon unterbunden werden (Abb. 3.36A).

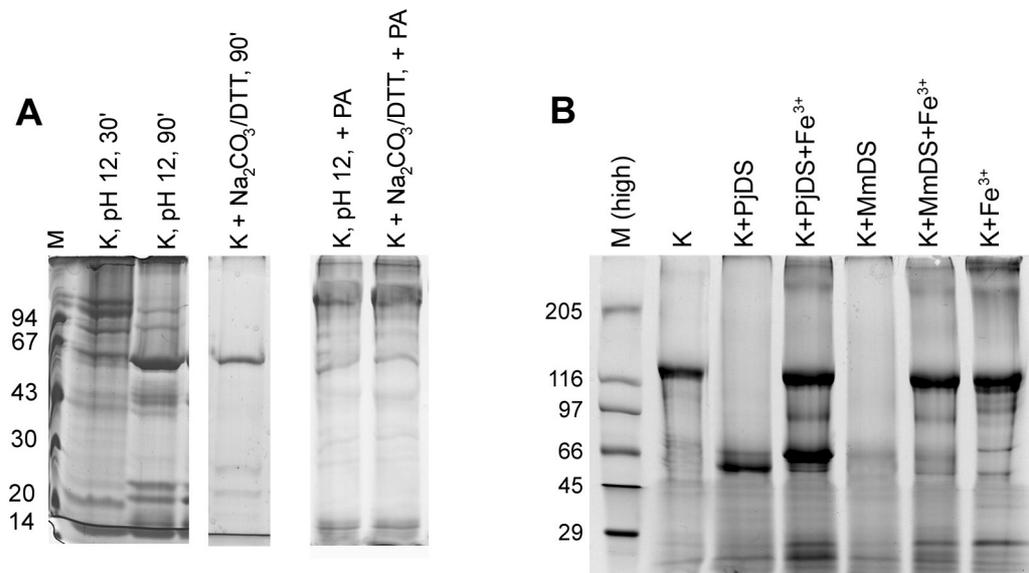


Abb. 3.36 Proteolytische Prozessierung des 130 kDa Protoxins (K, 3 mg/ml) während des Lösens der Kristalle (12 %ige SDS-PAGE). (A) Abbau des Protoxins zum aktiven 65 kDa Toxin. Bei Verkürzung der Inkubationszeit von 90 min auf 30 min sind beim Lösen unter stark alkalischen Bedingungen (50 mM Tris/NaOH pH 12) kurzzeitig auftretende Zwischenprodukte >65 kDa zu erkennen. Diese wurden bei reduzierend-chaotropen Bedingungen in geringem Umfang ebenfalls beobachtet (Na₂CO₃/DTT). Durch Hemmen der endogenen Protease mit 1 mM Phosphoramidon (PA) konnte der Abbauprozess (90 min) verzögert werden; (B) Abbau des Protoxins bereits durch eine einminütige Einwirkung der Darmsäfte (Endverdünnung 1:10) von *P. japonica* (PjDS) bzw. *M. melolontha* (MmDS); Hemmung des Abbaus durch 10 mM FeCl₃.

Bei Verwendung von Detergenzien zum Lösen von Kristallen erfolgte ein noch weitergehender Abbau, nämlich zu Fragmenten <10 kDa. Hierzu sei auf Kap. 3.6.4 verwiesen.

Während bislang das künstliche Lösen im Vordergrund stand, wurden bei den folgenden Untersuchungen die unbehandelten Darmsäfte von *P. japonica* und *M. melolontha*, sowie die dialysierten Darmsäfte eingesetzt, um deren Auswirkungen auf die Kristalle und das Protoxin zu analysieren.

Bei beiden Arten wurden die Kristalle nach Zugabe der unbehandelten Darmsäfte gelöst und das Protoxin proteolytisch abgebaut (Abb.3.36B). Im Falle von *P. japonica* entstand hierdurch ein Fragment bei 55 kDa Toxin, bei *M. melolontha* erfolgte ein weitergehender Abbau zu Fragmenten <10 kDa. Diese Prozesse konnten durch Einsatz spezifischer Inhibitoren, insbesondere Phosphoramidon, das die endogene Protease hemmt (Abb. 3.36; Kap. 3.5), nicht unterbunden werden (ohne Abb.). Hingegen führte der Einsatz von Eisenchlorid zum weitgehenden Erhalt des 130 kDa Protoxins, sowie dem Auftreten des 65 kDa Toxins bei *P. japonica*. Zur Rolle des Eisenchlorids siehe Kap. 3.7.3.

Für den Abbau des Protoxins war entscheidend, ob die Darmsäfte unbehandelt oder dialysiert eingesetzt wurden: Abb. 3.37A zeigt im Falle von *M. melolontha*, dass das Protoxin mit dialysiertem Darmsaft bei einer einminütigen Inkubation erhalten blieb. Die Aktivität der Einzelproteasen blieb dabei trotz Dialyse unverändert (Abb. 3.37B). Der Unterschied zu unbehandeltem Darmsaft kam offenbar durch die Entfernung niedermolekularer Bestandteile (Ausschlussgrenze 5 kDa) zustande. Dabei handelte es sich möglicherweise um Biotenside, redoxaktive Substanzen etc., die zum Lösen der Kristalle unabdingbar sind. Eine genauere

Untersuchung zum Einfluss solcher Stoffe auf den Toxinabbau wird in Kap. 3.6.4 und 3.6.5 dargestellt.

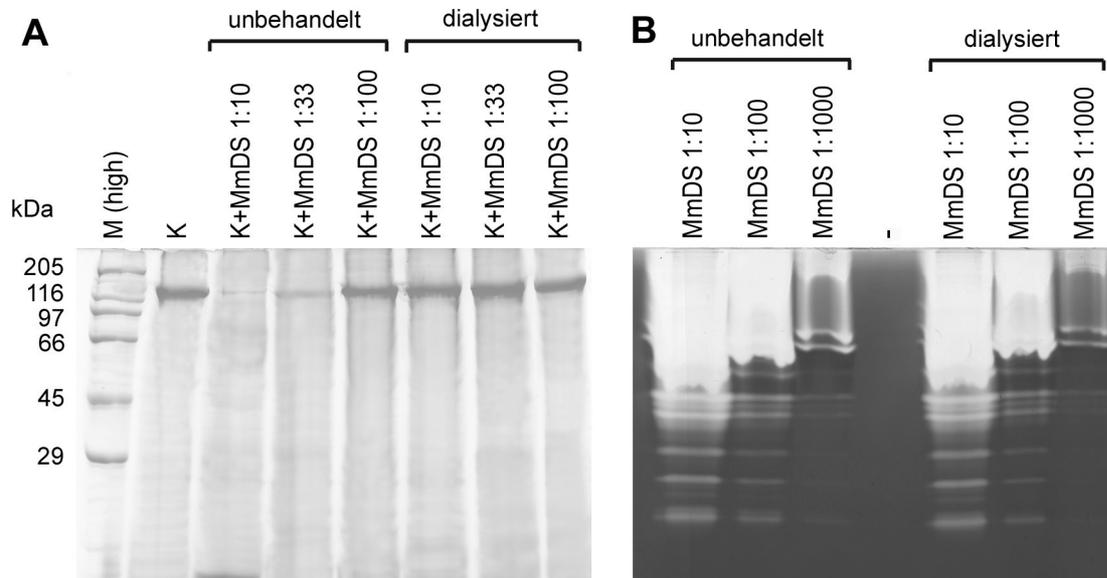


Abb. 3.37 Vergleich des Abbaus der Toxinkristalle in unbehandeltem und dialysiertem Darmsaft von *M. melolontha* (MmDS); (A) 12 %ige SDS-PAGE. 1 mg/ml Kristalle (K) wurden mit verschiedenen Darmsaft-Verdünnungen für 1 min inkubiert; (B) Copolymerisationszymogramm zum Nachweis der unveränderten Aktivität aller Proteasen nach Dialyse.

3.6.3 Proteolytische Prozessierung des 65 kDa Toxins zu 55 kDa

In den weiteren Untersuchungen wurden nun die Darmsäfte von *M. melolontha* und *P. japonica* eingesetzt, deren Proteasen in Kap. 3.1 – 3.3 charakterisiert worden sind, um den weiteren proteolytischen Abbau des 65 kDa Toxins zu analysieren. Von besonderem Interesse war nun, ob sich hierbei Unterschiede zwischen einer Cry8C-resistenten und einer –sensitiven Scarabaeidenart ergeben würden.

Hierbei zeigten sich folgende Ergebnisse:

1. Das 65 kDa Toxin wurde bei beiden Arten zu einem stabilen 55 kDa-Fragment prozessiert (Abb. 3.38A, B). Beide Prozesse erfolgten in einer ähnlichen Geschwindigkeit, nämlich ca. 30 min bis zur vollständigen Umsetzung.
2. Für diesen Prozess waren hauptsächlich trypsinartige Aktivitäten verantwortlich. Der Abbau des 65 kDa Toxins wurde durch Inhibitoren gegen trypsinartige Serinproteasen wie SBTI und TLCK bei beiden Arten unterbunden (Abb. 3.39A, B). Zwar verzögerte mit Elastatinal auch ein Inhibitor elastaseartiger Serinproteasen diesen Prozess (siehe 3minütige Inkubation), das Erscheinen des 55 kDa-Fragments nach 30 min zeigte jedoch, dass dieser Inhibitor weitaus weniger effektiv war, da im Gegensatz zu TLCK und SBTI die Bande bei 65 kDa nicht erhalten blieb. Weitere Inhibitoren blieben ohne Effekt.
3. Rindertrypsin und das Trypsin eines weiteren Arthropoden, des Flusskrebsses *Astacus astacus*, führten zu dem gleichen Abbau (Abb. 3.38C-E).

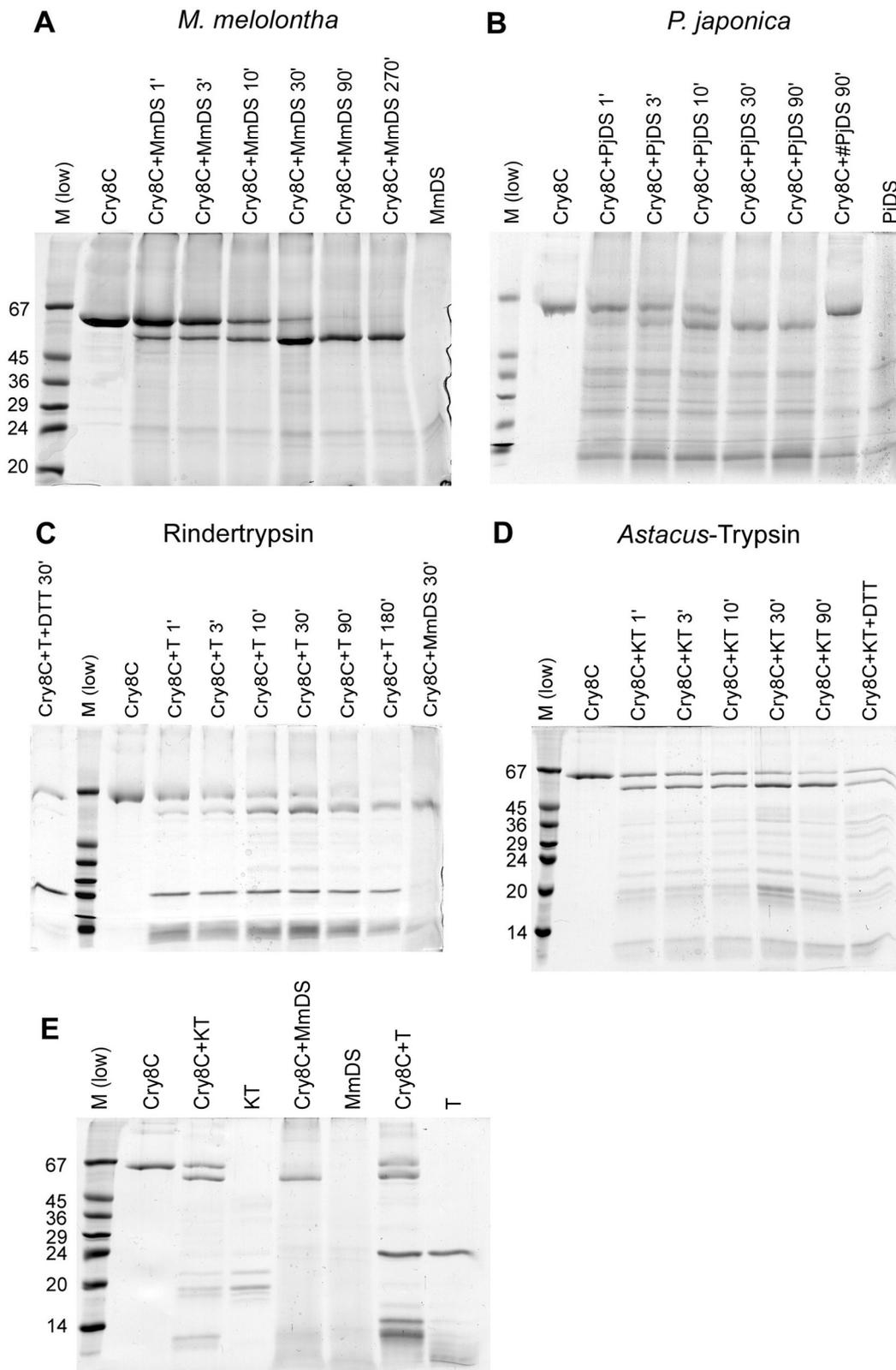


Abb. 3.38 Zeitabhängige proteolytische Prozessierung des gelösten 65 kDa Cry8C-Toxins zu 55 kDa (15 %ige SDS-PAGE). (A) Inkubation des Toxins (0,7 mg/ml) mit dem Darmsaft von *M. melonontha* (MmDS, Endverdünnung 1:10) für eine definierte Zeitdauer; (B) dito, jedoch mit Darmsaft von *P. japonica* (PjDS, Endverdünnung 1:10). Als Negativkontrolle diente hitzedenaturierter Darmsaft (#PjDS); (C) dito, jedoch mit 0,3 mg/ml Rindertrypsin (T). Diese Konzentration entspricht der photometrisch bestimmten BAPNA-Aktivität von MmDS 1:10 (nicht gezeigt); (D) dito, jedoch mit 1,5 mg/ml Krebsstrypsin (KT) von *Astacus astacus*. Diese Konzentration entspricht der BAPNA-Aktivität von MmDS 1:10. (E) Direkte Gegenüberstellung einiger dieser

Abbauprozesse. Hierbei wurde bewusst eine Inkubationszeit (30 min) gewählt, die einen unvollständigen Abbau zeigte und die gegenseitige Zuordnung einzelner Banden erlaubte.

Als Nachweis für die Herkunft einiger niedermolekularer Banden wurden die toxischen Ansätze MmDS und PjDS zur Kontrolle ebenfalls analysiert. Zudem wurde in C und D in Ergänzung zu Kap. 3.6.5 und 3.6.6 der Einfluss reduzierender Bedingungen auf den vorliegenden Abbauprozess untersucht, der an entsprechender Stelle erläutert wird.

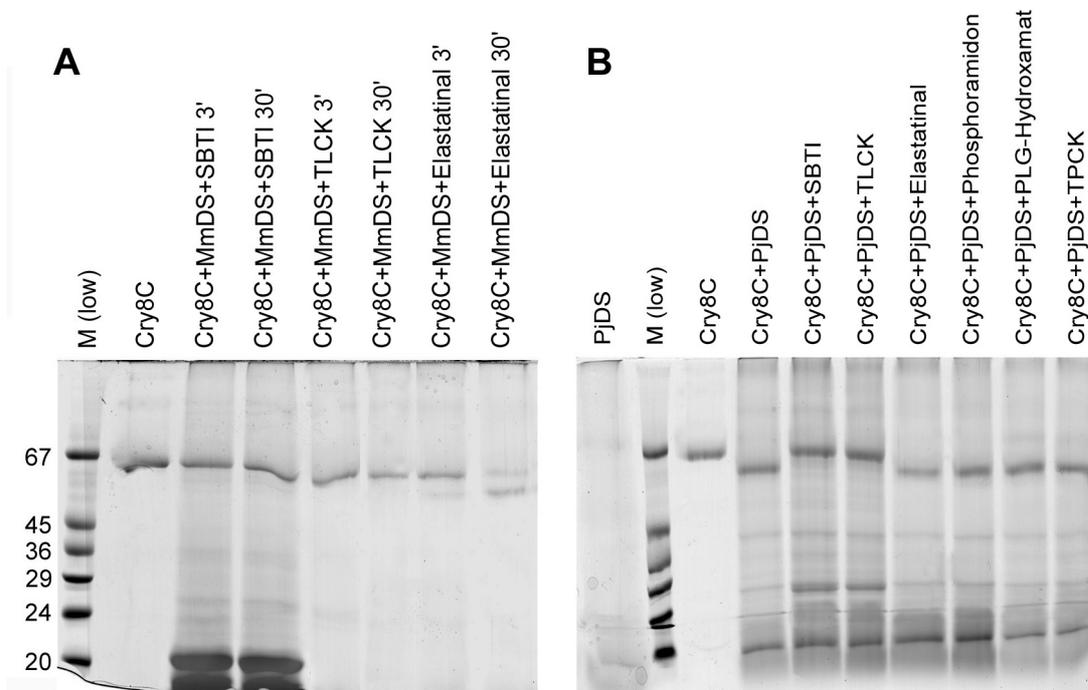


Abb. 3.39 Hemmung der proteolytischen Prozessierung des gelösten 65 kDa Cry8C-Toxins zu 55 kDa durch Protease-Inhibitoren (15 %ige SDS-PAGE). (A) Inkubation von 0,7 mg/ml Toxin mit Darmsaft von *M. melolontha* (MmDS, Endverdünnung 1:10) und Serinprotease-Inhibitoren (100 µg/ml SBTI, 2 mM TLCK, bzw. 4 mM Elastatinal); (B) Inkubation des Toxins mit Darmsaft von *P. japonica* (PjDS, Endverdünnung 1:10) und verschiedenen Protease-Inhibitoren (100 µg/ml SBTI, 2 mM TLCK, 4 mM Elastatinal, 0,8 mM Phosphoramidon, 4 mM PLG-Hydroxamat, bzw. 4 mM TPCK) für 30 min.

Eine N-terminale Ansequenzierung der Aminosäuresequenz des 55 kDa-Fragments lieferte die Abfolge ISAQDA. Diese Sequenz beginnt acht Aminosäuren nach dem von Hori (1994) beschriebenen N-Terminus des aktiven 65 kDa Toxins (s. Kap. 4.3.4; Abb. 4.1).

3.6.4 Abbauverhalten des 65 kDa Toxins unter Detergens-Bedingungen

Ein physiologischer Faktor, der neben den Proteasen den Toxinabbau beeinflussen könnte, ist die Präsenz von Biotensiden. Diese sind bei Insekten weit verbreitet und die Tatsache, dass eine Reihe von Darmsaft-Proteasen unter SDS-Bedingungen ihre Aktivität behalten (Kap. 3.11), spricht für deren Existenz auch bei *M. melolontha*. Mit dem Einsatz von SDS und Triton X-100 wurden diese Bedingungen simuliert.

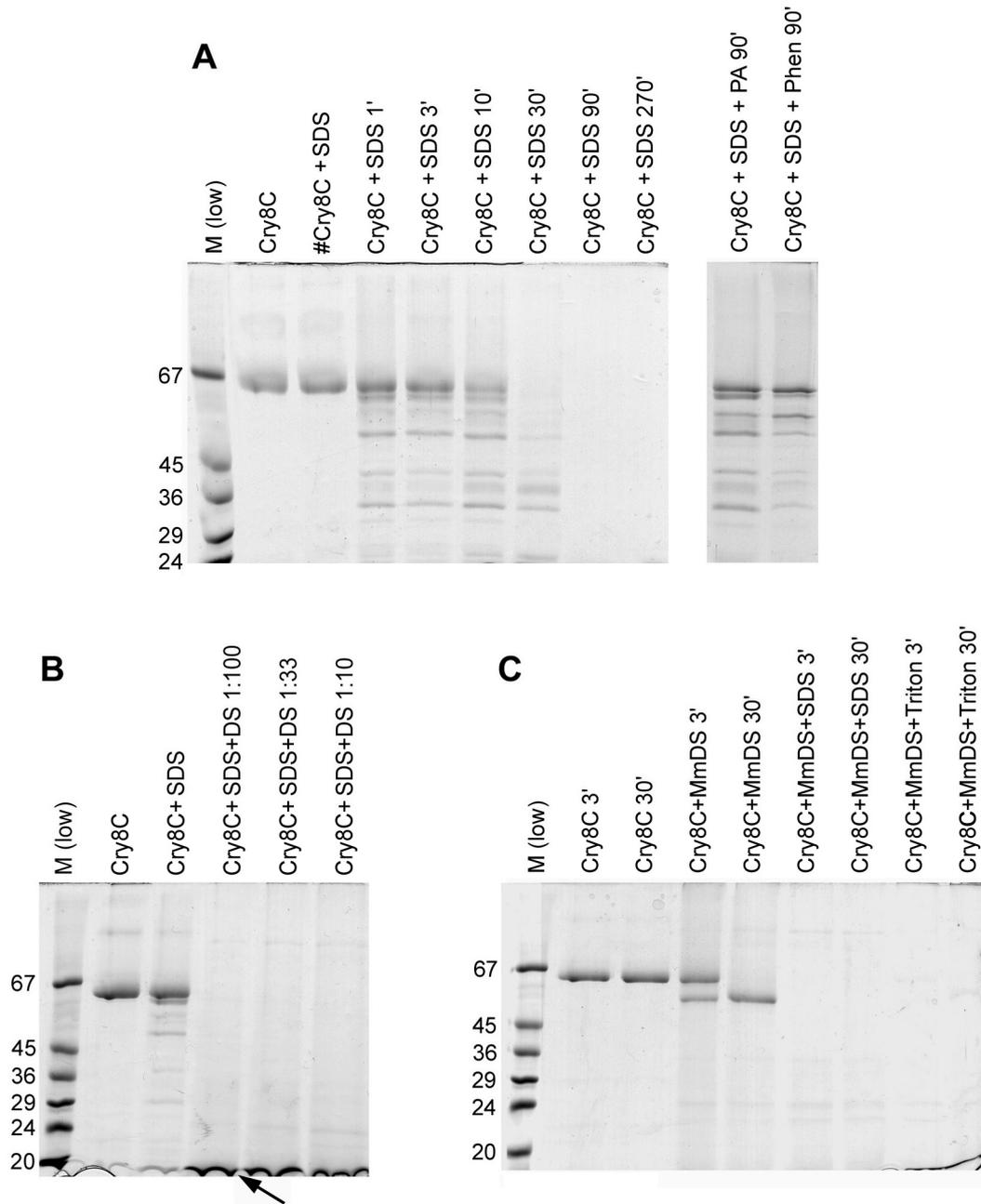


Abb. 3.40 Einfluss von Detergenzien auf die proteolytische Prozessierung des gelösten 65 kDa Cry8C-Toxins (15 %ige SDS-PAGE). (A) Zeitabhängiger Abbau des Toxins (0,7 mg/ml) unter SDS-Bedingungen (0,1 %) bereits ohne Einwirkung der Darmsaft-Proteasen; Verhinderung des Abbaus durch Verwendung einer hitzedenaturierten Toxinprobe (#Cry8C) oder durch Zusatz von 1 mM Phosphoramidon bzw. 10 mM 1,10-Phenanthrolin; (B) Abbau des Toxins während einer einminütigen Inkubation mit verschiedenen Darmsaftverdünnungen (MmDS) und 0,1 % SDS; kleine Abbaufragmente in der Lauffront wurden mit einem Pfeil markiert; (C) Abbau des Toxins bei Inkubation mit MmDS und 0,1 % SDS bzw. 2,5 % Triton X-100.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Bereits ohne die Proteasen des Darmsafts führte der Zusatz von SDS innerhalb von 90 min zu einem Abbau des 65 kDa Toxins zu Fragmenten <10 kDa (Abb. 3.40A). Die Ursache hierfür lag in der Präsenz einer endogenen Protease von BTJ in der Toxinpräparation, die durch die Aufreinigung nicht vollständig entfernt werden konnte (Kap. 3.5). Durch Hitzeinaktivierung oder Verwendung der spezifischen Inhibitoren Phosphoramidon und 1,10-Phenanthrolin konnte dieser Abbau verhindert bzw. verzögert werden.
2. Der Abbau des Toxins zu Fragmenten <10 kDa unter SDS-Bedingungen lief beschleunigt ab (1 min), wenn bereits geringe Mengen Darmsaft hinzugegeben wurden (Abb. 3.40B).

3.6.5 Abbau des 65 kDa Toxins unter reduzierenden bzw. chaotropen Bedingungen

Mit dem Einsatz des reduzierenden Thiols DTT bzw. des chaotropen Salzes Na_2CO_3 wurden neben den Detergenzien weitere Agenzien getestet, die die Tertiärstruktur von Proteinen verändern können und evtl. interne Schnittstellen von Substraten wie Cry8C freilegen können, wodurch ein weiterer proteolytischer Abbau durch Darmsaft-Proteasen ermöglicht werden könnte. Da reduzierende Bedingungen im Mitteldarm von *M. melolontha* in situ nachgewiesen werden konnten, waren Abbauversuche mit Cry8C erforderlich, die diese Tatsache berücksichtigten. Als Ergänzung seien die Vorgänge unter chaotrope Bedingungen geschildert.

Im Gegensatz zum Abbau durch die endogenen Proteasen von BTJ bei Anwesenheit von SDS (Kap. 3.6.4) führten reduzierende oder chaotrope Bedingungen alleine nicht zu einem Abbau des 65 kDa Toxins (Abb. 3.41A). Bei zusätzlicher Anwesenheit der Proteasen des Maikäfer-Darmsafts erfolgte hingegen ein direkter Abbau zu Fragmenten <10 kDa. Dieser Prozess erwies sich abhängig von der Stärke der reduzierenden bzw. chaotropen Bedingungen (Abb. 3.41B, C): Im Falle von DTT wurde der Abbau erst ab einer Konzentration von ca. 250 mM erreicht. Dies entspricht einem Redoxpotential von -140 mV (siehe Abb. 3.28) und kommt dem Potential des Darmsafts von *M. melolontha* (L2) in situ gleich (siehe Abb. 3.25B). Im Gegensatz hierzu blieb das 65 kDa Toxin bei einer DTT-Konzentration von 5 mM (ca. -30 mV) erhalten. Solche Bedingungen herrschen im Mitteldarm von *P. japonica* (L3).

Im Falle von Na_2CO_3 wurde der vollständige Abbau der 65 kDa Bande ebenfalls erst bei einer Konzentration von ca. 250 mM beobachtet.

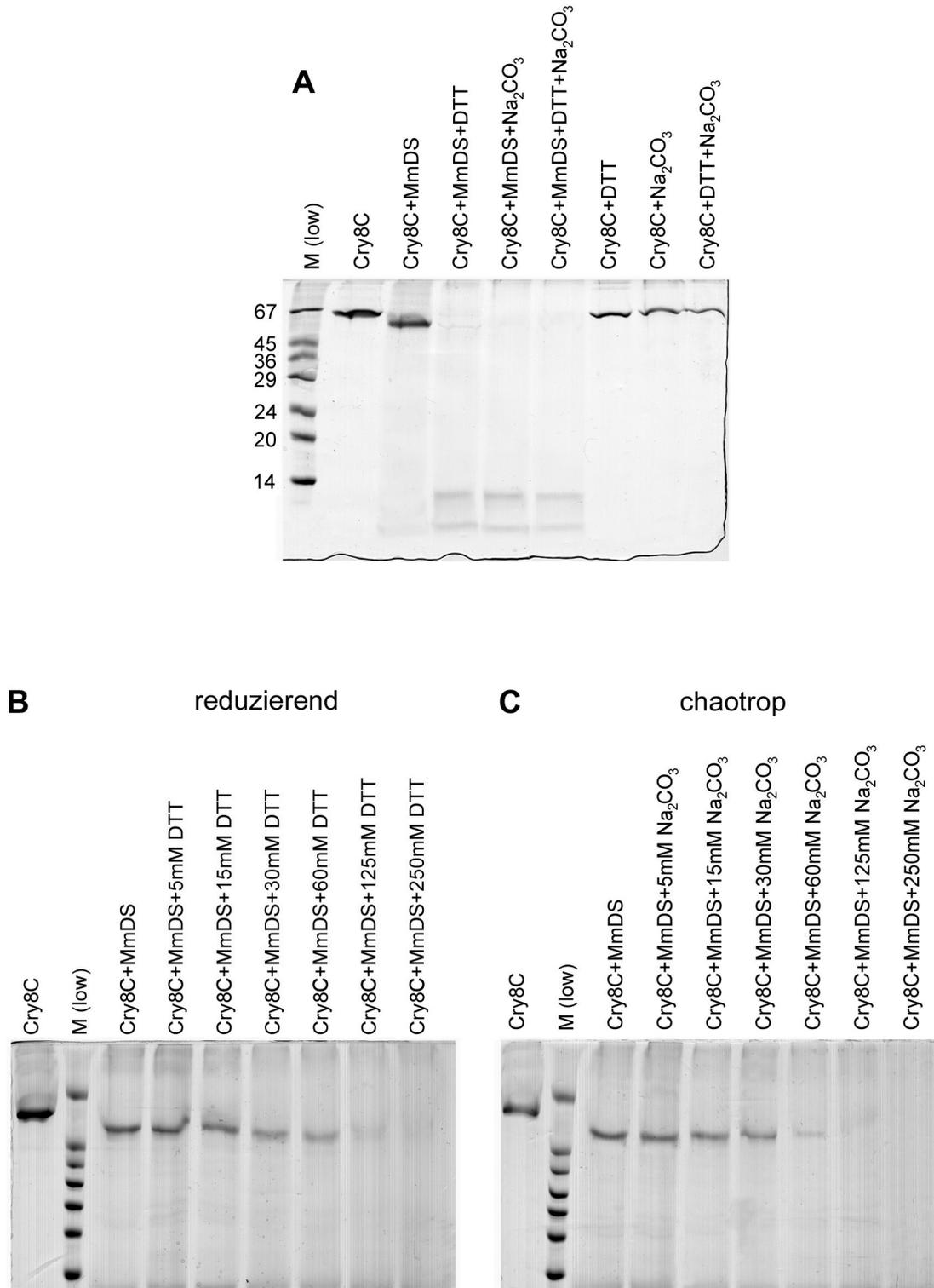


Abb. 3.41 Einfluss reduzierender und/oder chaotroper Bedingungen auf die proteolytische Prozessierung des gelösten 65 kDa Cry8C-Toxins während einer 45-minütigen Inkubationsdauer. (A) 17,5 %ige SDS-PAGE; 0,7 mg/ml Toxin wurde mit/ohne Darmsaft von *M. melolontha* (MmDS, Endkonzentration 1:10) sowie 250 mM DTT und/oder 250 mM Na_2CO_3 inkubiert; (B) 15 %ige SDS PAGE, DTT-Konzentrationsabhängiger Abbau; (C) 15 %ige SDS, Na_2CO_3 -Konzentrationsabhängiger Abbau.

Proteolytische Kombinationsversuche mit den Proteasen von *M. melolontha* bzw. *P. japonica*, bei denen das Redoxpotential des eigenen bzw. des anderen Darmsafts simuliert wurde, führten zu folgenden Ergebnissen (Abb. 3.42):

1. Das 65 kDa Toxin blieb in keinem der Kombinationsansätze erhalten, also auch nicht beim Cry8C-sensitiven Japankäfer. Dies entsprach den Ergebnissen aus Kap. 3.6.3.
2. Wurde ein Redoxpotential simuliert, das dem Niveau des Darmsafts von *P. japonica* in situ entsprach (ca. -30 mV, entspricht ca. 5 mM DTT), erfolgte – wie in Kap. 3.6.3 - durch beide Darmsäfte eine proteolytische Prozessierung zu einem stabilen 55 kDa-Fragment.
3. Bei einem Redoxpotential, wie es im Darmsaft von *M. melolontha* herrscht (ca. -140 mV, entspricht 250 mM DTT), konnte bei beiden Darmsäften ein Abbau zu Fragmenten <10 kDa nachgewiesen werden. Im Falle des Japankäfers wurden dabei kurzzeitig auftretende Zwischenprodukte bei ca. 50 und 55 kDa beobachtet, die allerdings bei einer Verdopplung der Inkubationszeit nicht mehr nachzuweisen waren (ohne Abb.).

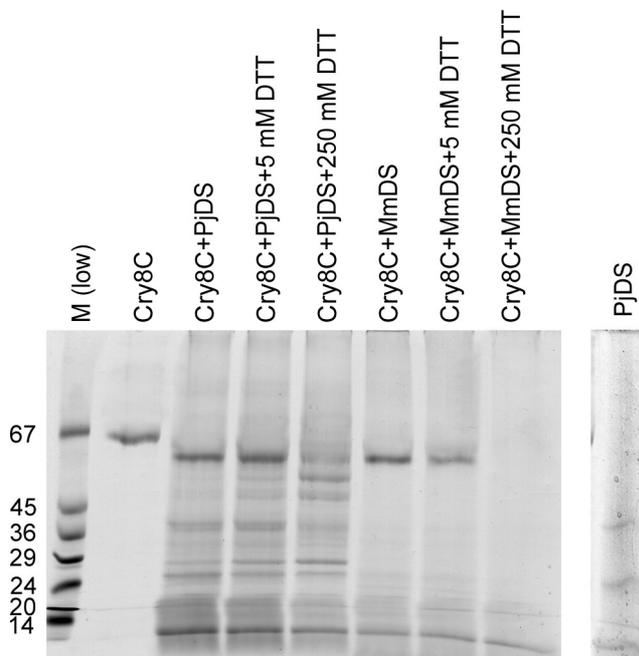


Abb. 3.42 Redoxpotential-abhängige proteolytische Prozessierung des gelösten 65 kDa Cry8C-Toxins durch die Darmsaft-Proteasen von *P. japonica* bzw. *M. melolontha* während einer 90-minütigen Inkubationsdauer (15 %ige SDS-PAGE). 0,7 mg/ml Toxin wurde dabei mit Darmsaft von *P. japonica* (PjDS, Endkonzentration 1:10) bei einem Redoxpotential inkubiert, das einem der beiden Scarabaeiden in situ entsprach. Dieses wurde mit einer definierten DTT-Konzentration simuliert, die in Kap. 3.4.3 bestimmt wurde. Um auftretende Toxin-Abbaubanden von Darmsaft-Banden zu unterscheiden, wurde die PjDS-Kontrolle aus Abb. 3.38B hier nochmals dargestellt.

Der Abbau des 55 kDa-Fragments konnte durch eine Kombination von Protease-Inhibitoren unterbunden werden, bei der die trypsin- und elastaseartigen Aktivitäten gleichzeitig gehemmt wurden, d. h. entweder durch den minderspezifischen Trypsininhibitor der Sojabohne (SBTI) oder durch den parallelen Einsatz von TLCK und Elastatinal (Abb. 3.43). Die alleinige Verwendung dieser beiden hochspezifischen Inhibitoren, sowie die Metalloproteasen-Hemmer 1,10-Phenanthrolin und PLG-Hydroxamat verhinderten den Abbauprozess nicht.

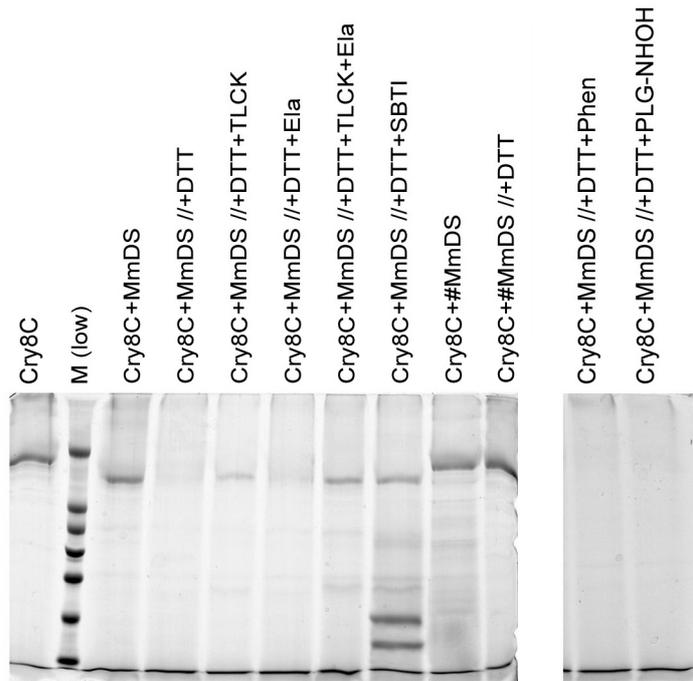


Abb. 3.43 Hemmung des proteolytischen Abbaus unter reduzierenden Bedingungen durch Protease-Inhibitoren (15 %ige SDS-PAGE). 0,7 mg/ml gelöstes 65 kDa Cry8C-Toxin wurde durch eine 45-minütige Präinkubation mit Darmsaft von *M. melonontha* (MmDS) zu 55 kDa prozessiert. Anschließend (//) wurden die Reaktionsansätze zunächst mit Inhibitoren (2 mM TLCK, 4 mM Elastatinal, 100 µg/ml SBTI, 10 mM 1,10-Phenanthrolin (Phen), 10 mM PLG-NHOH), dann mit 250 mM DTT ergänzt (Angabe der Endkonzentrationen) und für 1 min inkubiert. Als Kontrolle wurde hitzedenaturierter Darmsaft (#MmDS) eingesetzt.

3.6.6 Prozessierung durch teilgereinigte Proteasen

Im Gegensatz zur Verwendung des normalen Darmsafts, bei dem die Gesamtheit der Proteasen vorliegen und nur der Einsatz von Inhibitoren Aussagen über die Beteiligung einzelner Proteasen an proteolytischen Prozessen liefern kann, wurden hier isolierte Darmsaft-Proteasen bzw. -Proteasengruppen dazu eingesetzt, den Abbau des 65 kDa Toxins zu untersuchen und die bisherigen Ergebnisse der Kapitel 3.6.3 bis 3.6.5 zu kontrollieren. Die Bereitstellung der Fraktionen wurde in Kap. 3.6.1 erläutert.

Für die folgenden proteolytischen Untersuchungen wurde mit 16 h bewusst eine lange Inkubationszeit gewählt, da das Ziel darin bestand, die Beteiligung bestimmter Proteasen an dem Abbauprozess auszuschließen. Der Einfluss einiger schwächerer Aktivitäten wäre bei kürzeren Inkubationszeiten u. U. nicht nachweisbar gewesen.

Die Metalloproteasen bei 14 kDa (M14), 23 kDa (M23, = Maikäfer-Astacin), die nichtspezifizierten Proteasen >100 kDa (P100) und Fraktionen, bei denen die elastaseartigen Serinproteasen dominierten (Fraktionen Nr. 11, 16), führten trotz der langen Inkubationszeit nicht bzw. kaum zu einem Abbau des 65 kDa Toxins (Abb. 3.44A) – selbst nicht bei stark reduzierenden Bedingungen (Abb. 3.44B). Im Gegensatz hierzu kam es bei der Verwendung der anionischen Trypsine (D1) und bei Mischfraktionen, die v. a. die kationische typsinartige Serinprotease bei 18 kDa enthielten (Fraktionen Nr. 6, 8) zu einer Prozessierung zu 55 kDa. Unter reduzierenden Bedingungen erfolgte bei diesen Ansätzen sogar ein Abbau zu Fragmenten <10 kDa.

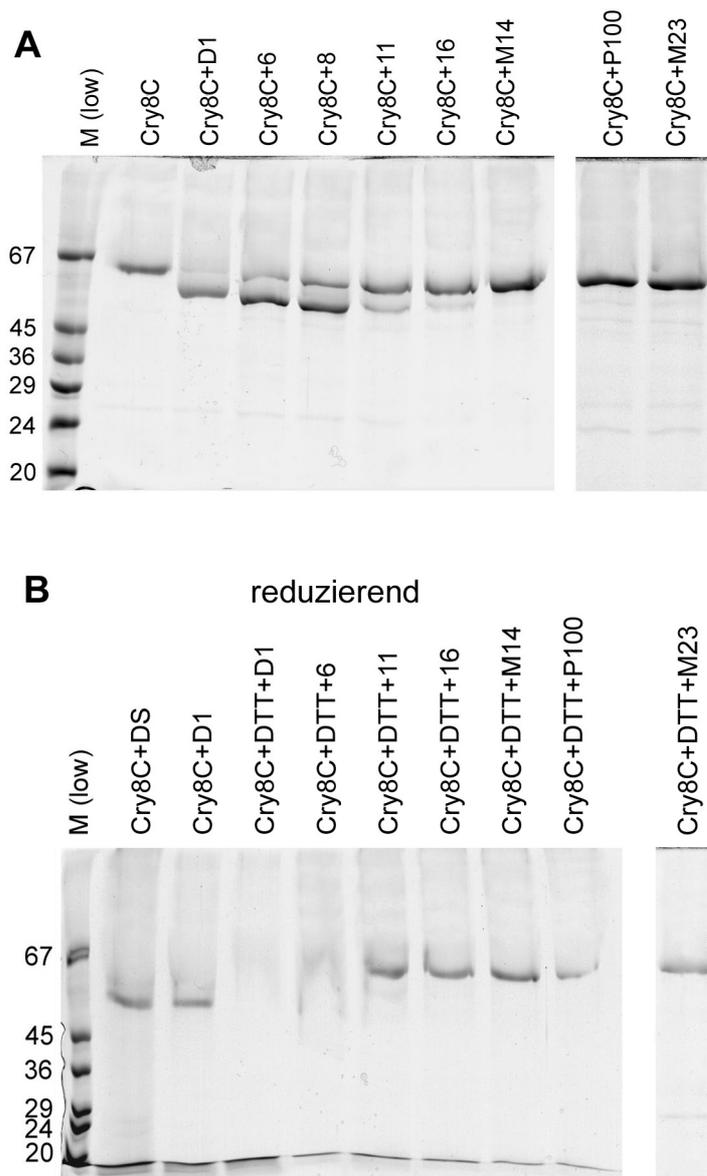


Abb. 3.44 Proteolytische Prozessierung des gelösten 65 kDa Cry8C-Toxins durch teilgereinigte Proteasen bzw. Proteasengruppen des Darmsafts (15 %ige SDS-PAGE). 0,7 mg/ml Toxin wurde mit ausgewählten Fraktionen einiger Chromatographietechniken (Kap. 3.6.1) für 16 h inkubiert, deren Bezeichnung und Protease-Zusammensetzung den dortigen Abbildungen zu entnehmen sind. (A) Abbau des Toxins zu 55 kDa; (B) Abbauverhalten unter reduzierenden Bedingungen (250 mM DTT).

3.7 Biotests

3.7.1 Biotests mit *P. japonica*

Um die Toxizität einzelner Abbaufragmente des BTJ-Toxins zu überprüfen, wurden Biotests mit den Cry8C-sensitiven Larven von *P. japonica* durchgeführt. Diese Art sollte als Positivkontrolle für die Toxizität der Kristalle und des 65 kDa Toxins dienen. Zudem musste geklärt werden, ob durch die künstlichen reduzierend-chaotropen Lösungsbedingungen in vitro die Aktivität des Toxins erhalten bleibt. Darüber hinaus sollte die Toxizität des 55 kDa Abbauproduktes und der Fragmente <10 kDa überprüft werden.

In den Biotests wurden 2,25 µg Protein (BTJ-Kristallsuspension, das 65 kDa Toxin, das 55 kDa Fragment, oder die Fragmente <10 kDa) direkt gefüttert und die Aufnahme kontrolliert. Die eingesetzte Proteinmenge entsprach ungefähr dem LD₅₀-Wert, der bei Zweitlarven von *Anomala cuprea*¹ ermittelt worden war (Suzuki 1993).

Die Tests führten bei den Kristall- und 65 kDa Toxinansätzen zu einer signifikant höheren Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 3.1). Hiermit konnte die in der Literatur beschriebene Toxizität des Buibui-Stammes durch die eigenen Testbedingungen reproduziert werden und zudem nachgewiesen werden, dass die hier verwendeten Reinigungs- und Lösungsmethoden nicht zu einer Inaktivierung des Toxins führen. Die Kristalle bewirken im Vergleich zum gelösten 65 kDa Toxin keine signifikant höhere Mortalität ($p = 0,08 > 0,05$).

Bei dem 55 kDa Fragment und den Fragmenten <10 kDa konnte keine Toxizität nachgewiesen werden.

Tab. 3.1 Biotests mit 25 Zweitlarven/Ansatz von *P. japonica*. Hierbei wurde die Toxizität der Kristalle von BTJ als auch die in Kap. 3.6 charakterisierten Abbauprodukte des Cry8C-Protoxins überprüft. Die statistische Endauswertung nach 21 Tagen erfolgte mit dem Fischer-Test.

Testgruppe (n=25)	Mortalität	signifikante Abweichung von der Kontrolle (= Toxizität)
Kontrolle	16 %	-
Kristalle	72 %	ja ($p = 0,00007 < 0,05$)
65 kDa Toxin	52 %	ja ($p = 0,007 < 0,05$)
55 kDa Fragment	24 %	nein ($p = 0,25 > 0,05$)
Fragmente <10 kDa	24 %	nein ($p = 0,25 > 0,05$)

3.7.2 Biotests mit *M. melolontha*

Die folgenden Biotests mit Cry8C-resistenten Larven des Feldmaikäfers sollten als Negativkontrolle die Unwirksamkeit des Toxins² dokumentieren, die bereits in meiner Diplomarbeit festgestellt worden war (Wagner 1999). Der Sinn dieser Wiederholung bestand aber auch darin, einen direkten Vergleich zu den in Kap. 3.5.1 und 3.5.3 verwendeten Toxinkonzentrationen, Haltungsbedingungen und Tiermaterialien zu ermöglichen.

¹ Aus Mangel eines LD₅₀-Literatur-Werts für *P. japonica* wurden die Ergebnisse bei *A. cuprea* für die eigenen Untersuchungen zugrunde gelegt (LD₅₀ = 0,3 µg Toxin).

² Die „Unwirksamkeit“ bezieht sich auf die gewählten Biotest-Rahmenbedingungen. Durch Einsatz von Stressfaktoren konnte eine Wirksamkeit erzielt werden.

Die Biotests bei *M. melolontha* wurden unter den gleichen Voraussetzungen wie in Kap. 3.5.1 durchgeführt. Hierbei ergaben sich bei den einzelnen Toxinansätzen keine signifikanten Abweichungen zur Kontrollgruppe, d. h. Cry8C zeigte keine Toxizität gegen die Engerlinge (Tab. 3.2).

Tab. 3.2 Biotests mit Zweitlarven von *M. melolontha*. Die statistische Endauswertung nach 21 Tagen erfolgte mit dem χ^2 -Vierfeldertest.

Testgruppe (n=30)	Mortalität	signifikante Abweichung von der Kontrolle
Kontrolle	10 %	-
Kristalle	23 %	nein ($\chi^2_{0,05} = 1,08 < 3,84$)
65 kDa Toxin	20 %	nein ($\chi^2_{0,05} = 0,52 < 3,84$)
55 kDa Fragment	10 %	nein ($\chi^2_{0,05} = 0,19 < 3,84$)
Fragmente <10 kDa	13 %	nein ($\chi^2_{0,05} = 0,01 < 3,84$)

3.7.3 Erhöhung des Redoxpotentials und Biotests

In vitro konnte gezeigt werden, dass die Darmsaft-Proteasen des Maikäfers unter dem simulierten Redoxpotential des Japankäfer-Mitteldarms das Cry8C-Toxin nicht zu Fragmenten <10 kDa abbauen können (Kap. 3.6.5).

Um das 65 kDa Toxin in vivo vor einem raschen Abbau zu schützen, wurde im Folgenden das im Mitteldarm von *M. melolontha* herrschende Redoxpotential in situ künstlich auf das Niveau von *P. japonica* angehoben und die Toxizität überprüft. Hierzu wurde Fe^{3+} , ein mildes Oxidationsmittel, eingesetzt.

Zunächst wurde in Vorversuchen die ungefähre Oxidationsmittel-Konzentration ermittelt, die notwendig ist, um ein gegebenes Redoxpotential entscheidend zu erhöhen (Tab. 3.3). Hierbei zeigte sich, dass dieses bei einer Fe^{3+} -Konzentration zwischen 2 und 4 mM sprunghaft anstieg. Der Sprung war unabhängig davon, ob mit DTT eine weitere redoxaktive Substanz vorhanden war oder nicht. DTT beeinflusste lediglich die Höhe des Ausgangs- und des Endpotentials.

Tab. 3.3 Von der Konzentration des Oxidationsmittels Fe^{3+} abhängiges Redoxpotential verschiedener Pufferlösungen. Bei der mit * gekennzeichneten Zelle sei auch auf Abb. 3.28 verwiesen. Die Messungen erfolgten mit einer Mikroelektrode.

50 mM Tris/HCl pH 8,0 + $[\text{Fe}^{3+}]$	Redoxpotential (mV)
0 mM	+ 290
0,1 mM	+ 330
2 mM	+ 335
4 mM	+ 820
8 mM	+ 840
64 mM	+ 865
1 M	+ 865

50 mM Tris/HCl pH 8,0 + 250 mM DTT + $[\text{Fe}^{3+}]$	Redoxpotential (mV)
0 mM	- 125 *
0,1 mM	- 140
2 mM	- 140
4 mM	+ 165
10 mM	+ 170

Ausgehend von diesem Ergebnis wurde die Menge an FeCl_3 berechnet, die in Biotests verfüttert werden musste, um im Mitteldarm von *M. melolontha* (Volumen ca. 100 μl) eine Fe^{3+} -Konzentration von mindestens 4 mM zu erreichen.

Derart behandelte Tiere zeigten bei Elektrodenmessungen in situ eine Erhöhung des Mitteldarm-Redoxpotentials, die stabil über viele Stunden andauerte (Tab. 3.4) und ungefähr dem Potentialniveau von *P. japonica*-Zweitlarven entsprach, bzw. leicht darüber lag. Eine 14-tägige Beobachtung der Tiere zeigte zudem, dass diese durch Verfüttern des Oxidationsmittels nicht sichtbar geschädigt worden waren.

Tab. 3.4 In situ-Messung des Mitteldarm-Redoxpotentials von Fe^{3+} -behandelten Zweitlarven von *M. melolontha*. Bei den mit * gekennzeichneten Messwerten sei auch auf Abb. 3.25B verwiesen.

Testgruppe (n=5)	Redoxpotential (mV)
unbehandelt	-134 \pm 81 *
nach 30 min	+130 \pm 10
nach 18 h	+107 \pm 13
nach 42 h	+120 \pm 20
L2 von <i>P. japonica</i>	+109 \pm 26 *

Die Verfütterung von BTJ-Kristallen oder gelöstem 65 kDa Toxin (wiederum 2,25 μg Protein) an Fe^{3+} -behandelte Engerlinge von *M. melolontha* führte zu keinem Anstieg der Mortalität (Tab. 3.5).

Aus Mangel an Tiermaterial konnte keine Positivkontrolle mit *P. japonica* durchgeführt werden, die hätte zeigen können, ob das Toxin nach Kontakt mit Fe^{3+} seine Aktivität behält.

Tab. 3.5 Biotests mit Zweitlarven von *M. melolontha*. Die statistische Endauswertung nach 21 Tagen erfolgte mit dem χ^2 -Vierfeldertest.

Testgruppe (n=30)	Mortalität	signifikante Abweichung von der Fe^{3+} -Kontrolle
Nullkontrolle	10 %	nein ($\chi^2_{0,05} = 0,0 < 3,84$)
Fe^{3+} -Kontrolle	13 %	-
Fe^{3+} + Kristalle	23 %	nein ($\chi^2_{0,05} = 0,45 < 3,84$)
Fe^{3+} + 65 kDa Toxin	17 %	nein ($\chi^2_{0,05} = 0,0 < 3,84$)

4 Diskussion

4.1 Proteasen

4.1.1 Allgemeines

Das Kristalltoxin von *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui, Cry8C, wurde durch Ohba (1992) als spezifisches Toxin gegen *Popillia japonica* und *Anomala*-Arten identifiziert. Die in meiner Diplomarbeit sowie hier beschriebenen Untersuchungen an *M. melolontha*, *M. hippocastani*, *Amphimallon solstitialis* und *Phyllopertha horticola* machten jedoch deutlich, dass diese Spezifität nicht generell für Scarabaeiden gilt, sondern nur die erst genannten Arten umfasst (Wagner 1999). Als plausible Ursache konnte hierfür die Beobachtung angeführt werden, dass das 130 kDa Protoxin nicht wie bei BT-sensitiven Organismen zu einem Protease-resistenten Kernfragment proteolytisch prozessiert wird, das für die Toxizität verantwortlich ist, sondern weiter zu Fragmenten <10 kDa abgebaut und somit inaktiviert wird. Proteolytische Versuche und Biotests zeigten, dass die für diesen Prozess mitverantwortliche tryptische Aktivität durch Beimischen von Trypsin-Inhibitoren zur Nahrung nicht derart gehemmt werden konnte, dass das Toxin nicht mehr inaktiviert würde. Daher war es geboten, die Zusammensetzung der Darmsaft-Proteasen eingehender zu analysieren, sowie weitere die Inaktivierung fördernde Faktoren (Kap. 4.2) zu identifizieren. Diese Ziele konnten in der vorliegenden Arbeit durch die Anwendung einer Reihe von analytischen Methoden (Zymogramm-Analyse, Aktivitätsblots, Einsatz hochspezifischer Protease-Inhibitoren und spaltungsspezifischer Substrate; Redoxpotentialmessungen) erreicht werden. Die Ergebnisse führten zu einem wesentlich verbesserten Verständnis der Resistenzursachen bei den betreffenden Scarabaeiden.

Die Kapitel 4.1.2 bis 4.1.6 beziehen sich auf die Identifizierung und Charakterisierung der Proteasen im Mitteldarm von *M. melolontha* (siehe auch Wagner 2002). Kapitel 4.1.7 geht danach auf das Proteasen-Spektrum weiterer untersuchter Scarabaeiden-Darmsäfte ein, insbesondere dem des Cry8C-sensitiven Japankäfers *P. japonica*. Hierin wird zudem ein Vergleich zu *M. melolontha* gezogen und bewertet, welche Faktoren der unterschiedlichen Darmphysiologie entscheidend für den Abbauprozess sein könnten.

4.1.2 Serinproteasen

Serinproteasen [EC 3.4.21.-] wurden mit p-Nitroanilid-Substraten identifiziert, deren Aminosäurereste an der P1 Position nach der Spaltungsspezifität der jeweiligen Enzyme ausgewählt wurden. Demzufolge wurden BApNA, AcFpNA und SAAP(L)pNA als Substrate für trypsin-, chymotrypsin- und elastaseartige Serinproteasen eingesetzt (BRENDA Datenbank). Die chromogenen Substratreaktionen und deren Hemmung wurde zum einen in photometrischen Tests durchgeführt, wodurch eine Quantifizierung der proteolytischen Aktivität möglich war und Bedingungen gewählt werden konnten, welche die Enzyme in ihrem nativen Zustand belassen. Zum anderen konnten durch Aktivitätsblots die Anzahl der beteiligten Aktivitäten und deren Molekularmassen bestimmt werden.

Von den mittels Zymographie ermittelten drei trypsinartigen Enzymen zeigten im Aktivitätsblot nur jene bei 56 and 63 kDa die spezifische BApNA-Reaktion. Dies mag auf die geringen Sensitivität der Aktivitätsblot-Technik zurückzuführen sein, wodurch schwache Aktivitäten wie jene bei 18 kDa nicht nachgewiesen werden können. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivität bei 18 kDa das chromogene Substrat überhaupt nicht spalten kann. Diese relativ niedermolekulare Aktivität verhielt sich auch bei der chromatographischen Trennung (Kap. 3.6.1) anders als die höhermolekularen Aktivitäten; es muss als kationisch eingestuft werden, während die beiden höhermolekularen Aktivitäten anionische Eigenschaften aufweisen.

Da die chelatierenden Agenzien EDTA und das Ca^{2+} -spezifische EGTA die Aktivität der trypsinartigen Serinproteasen herabsetzen, dürften wie bei Vertebraten-Trypsine [EC 3.4.21.4] Ca^{2+} -Ionen als Cofaktoren wirken (MEROPS Datenbank). Dies steht im Gegensatz zu anderen Insekten-Trypsinen, bei denen eine solche Ca^{2+} -Abhängigkeit nicht nachgewiesen werden konnte (Levinsky 1977; Johnston 1991; Lemos 1992).

Chymotrypsinartige Proteasen konnten nicht nachgewiesen werden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die verwendeten Substrate und Inhibitoren, die ursprünglich in Säuger-Systemen etabliert worden sind, aufgrund einer sich davon unterscheidenden Insektenphysiologie ungeeignet sind (Reeck 1999). Zum anderen könnten die verwendeten Messtechniken für eine potentiell vorhandene Aktivität zu unempfindlich sein.

Die drei elastaseartigen Serinproteasen zwischen 30 und 40 kDa konnten mit den typischen Substraten SAAPpNA, SAAPLpNA und STANA, sowie dem Inhibitor Elastatinal nachgewiesen werden. Zwar führte auch der Sojabohnen-Trypsininhibitor SBTI ebenfalls zu einer Aktivitätshemmung, was jedoch sehr wahrscheinlich auf die geringere Spezifität dieses Naturstoff-Inhibitors zurückzuführen ist.

Tab. 4.1 Übersicht über identifizierte Proteasen in den Mitteldärmen verschiedener Scarabaeidenarten. Abkürzungen: +, nachgewiesen; (+), aufgrund erster Untersuchungen wahrscheinlich; -, nicht nachgewiesen; ?, nicht untersucht. Bei den mit * gekennzeichneten Arten handelt es sich um selbst untersuchte Scarabaeiden, bei denen jedoch nicht alle Ergebnisse in dieser Arbeit dargestellt wurden.

Scarabaeidenart	trypsinartige Serinproteasen	chymotrypsinartige Serinproteasen	elastaseartige Serinproteasen	astacinartige Metalloproteasen	sonstige Metalloproteasen	Carboxypeptidasen	freie Amino-peptidasen	membranständige Amino-peptidasen
<i>M. melolontha</i>	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>M. hippocastani</i> *	+	-	+	(+)	?	-	+	+
<i>A. solstitialis</i> *	+	-	+	(+)	?	-	+	+
<i>P. japonica</i>	+	-	+	(+)	?	-	+	+
<i>Costelytra zealandica</i>	+	+	+	?	?	+	?	?
<i>Lepidiota noxia</i>	+	+	+	?	?	?	?	?
<i>Lepidiota negatoria</i>	+	+	+	?	?	?	?	?
<i>Antitrogus consanguineus</i>	+	+	+	?	?	?	?	?
<i>Oryctes nasicornis</i>	+	+	-	?	?	?	+	+

In Übereinstimmung mit *M. melolontha* findet man bei weiteren Scarabaeiden ebenfalls trypsin- und elastaseartige Proteasen (Tab. 4.1), nämlich bei den australischen/neuseeländischen Melolonthini-Arten *Lepidiota noxia*, *L. negatoria* und *Antitrogus consanguineus* (McGhie 1995), sowie bei *Costelytra zealandica* (Christeller 1989). Zudem konnten bei diesen auch chymotrypsinartige Proteasen nachgewiesen werden. Dem Nashornkäfer *Oryctes nasicornis* (Scarabaeidae) fehlen hingegen elastaseartige Enzyme (Bayon 1980). Dieser Vergleich verdeutlicht, dass verschiedene Arten einer Insektenfamilie durchaus unterschiedliche Enzymausstattungen besitzen können. Allerdings sollte man diese Ergebnisse unter Vorbehalt betrachten, da hier z. T. nur sehr unspezifische Substrate eingesetzt wurden und manche Methoden etwas fragwürdig erscheinen.

4.1.3 Metalloproteasen und speziell Astacin

Metallchelatoren wie EDTA, Dipicolinsäure, 8-Hydroxychinolin-5-Sulfonsäure oder 1,10-Phenanthrolin inaktivieren Metalloproteasen [EC 3.4.24.-] in einem zeitabhängigen Prozess, der von der Dissoziation des Metallions abhängt. 1,10-Phenanthrolin wurde für die Untersuchungen deshalb ausgewählt, weil hier die Inaktivierung am schnellsten vonstatten geht (Drum 1970; Kleeman 1986; Stöcker 1988). Durch Zymogramm-Analysen konnten hierdurch zwei Metalloproteasen mit 14 und 23 kDa identifiziert werden. Um deren Familienzugehörigkeit genauer zu bestimmen, wurde zunächst Phosphoramidon eingesetzt, das eine Reihe von Metalloproteasen hemmt, darunter die Thermolysine (Familie M4 in der Nomenklatur von Rawlings (1993) und Barret (1998); siehe auch die MEROPS Datenbank), Neprilysin (M13), Autolysin (M15), Pitrilysin (M16) und die Peptidyl-Lys Metalloendopeptidase (M35), nicht jedoch die Metzincin-Superfamilie (Moore 1986; Beckett 1996; Wolz 1990; Stöcker 1995) mit den Astacinen (M12A), den Adamlysinen, den Reprolysinen, den ADAMs (M12B/C), den Serralysinen (M10B) und den Matrix Metalloproteasen MMPs (M10A). (Einen Überblick liefert die BRENDA Datenbank.) Da Phosphoramidon keinen Effekt zeigte, konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die Metzincin-Superfamilie. Diese konnte mit dem nichtkompetitiven Inhibitor PLG Hydroxamat abgedeckt werden und führte zur Hemmung der Aktivitäten bei 14 und 23 kDa. Dies konnte jedoch erst bei relativ hohen Inhibitorkonzentrationen erreicht werden (20 mM in den fluorometrischen Tests), was bei diagnostischen Untersuchungen wenig aussagekräftig ist. Allerdings muss angeführt werden, dass die K_i -Werte innerhalb der Metzincin-Superfamilie stark variieren: Die α -Untereinheit der Meprine [EC 3.4.24.18] wird mit einem K_i von 0,45 μ M gehemmt, während der K_i der homologen β -Untereinheit etwa 100fach höher liegt (Köhler 2000; persönliche Mitteilung von W. Stöcker, Universität Münster). Dadurch kann das β Meprin nicht mit PLG Hydroxamat charakterisiert werden. Der K_i -Wert für Astacin [EC 3.4.24.21] liegt mit 16 μ M ebenfalls relativ hoch. Es gibt geeignetere Aminosäure-Hydroxamate, die für die Hemmung astacinartiger Metalloproteasen eingesetzt werden können (Wolz 1990), jedoch sind diese weniger spezifisch. Zudem kennt man derzeit noch keine geeigneten Inhibitoren, die eine eindeutige Zuordnung unbekannter Proteasen zu einer Familie innerhalb der Metzincin-Superfamilie zulassen (Beckett 1996; Yiallouros 1998). In Kombination mit einem Substrat ist es jedoch möglich, mindestens eine der Aktivitäten weiter einzugrenzen: N-dansylierte Oligopeptide sind häufig untersuchte Substrate für Astacine (Stöcker 1990, 1995). Das aufgrund seiner kinetischen Parameter am besten

geeignete Heptapeptid, DnsPKRAPWV, wird zwischen der Arg-Ala (P1-P1') –Bindung mit $K_{cat}/K_m = 1,4 \cdot 10^6$ gespalten (Stöcker 1990). Jedoch erlaubt der Arg-Rest auch eine tryptische Spaltung, weswegen dieses Substrat für diese Untersuchungen ungeeignet ist. Hier wurde ein Substrat eingesetzt, bei dem Arg durch Phe in der P1 Position substituiert ist. Allerdings liegt hier $K_{cat}/K_m = 1 \cdot 10^5$ um den Faktor 10 niedriger (persönliche Mitteilung von W. Stöcker). Der Vorteil besteht jedoch darin, dass die MMPs und die Adamlysins/Reprolysins/ADAMs im Gegensatz zu den Astacinen die Phe-Ala Peptidbindung nicht spalten können (BRENDA). Aufgrund der fluorometrisch nachgewiesenen Substratreaktion mit Dns-PKFAPWV und der erfolgreichen Hemmung mit 1,10-Phenanthrolin und PLG-Hydroxamat, wobei letztes zudem sehr effektiv in den Zymogrammen war, war es aufgrund dieser rein biochemischen Untersuchungen sehr wahrscheinlich, dass es sich bei einer der beiden Metalloproteasen um eine astacinartige Protease handeln könnte.

Dies konnte durch die N-terminale Sequenzierung bestätigt werden.

Bei den Vertretern der Metzincin-Superfamilie handelt es sich meist um Multidomänen-Proteine, die neben ihrer Protease-Funktion weitere nichtkatalytische, regulatorische Domänen besitzen, etwa EGF-artige Domänen, CUB-Domänen, Membranverankerungsdomänen etc. Diese Proteine dienen als Endopeptidase (Meprin A/B), Morphogen bei der Musterbildung (Tolloid, SPAN) etc. Ein Überblick bietet Stöcker (1993). Im Gegensatz hierzu besitzt das Verdauungsenzym Astacin – abgesehen von den N-terminalen Signal- und Prosequenzen – ausschließlich eine Protease-Domäne und ist somit im Vergleich zu seinen andersfunktionellen Homologen mit 23 kDa relativ klein. Mit einer durch SDS-PAGE bestimmten Molekularmasse von 24 kDa besitzt das *Melolontha*-Astacin eine ähnliche Größe, was seine alleinige Funktion als Verdauungsenzym nahe legt. Im Unterschied zu *Astacus* gehört diese Protease bei *Melolontha* nicht zu den vorherrschenden Aktivitäten, zu denen die trypsinartigen- und elastaseartigen Enzyme zu rechnen sind, sondern scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen. Möglicherweise könnte sie nur zum Aufschließen einer ganz bestimmten Nahrungsquelle von Nutzen sein.

In weiterführenden Untersuchungen wäre u. a. die Bestimmung der kinetischen Parameter K_{cat} , K_m , sowie der Substratspezifität etc. von Interesse, um die Verdauungsfunktion weiter zu charakterisieren und mit der Funktion des dekapoden Astacins vergleichen zu können.

Aufgrund der nun bekannten N-terminalen Sequenz können weiterführende Arbeiten auch auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt werden. Unter Zuhilfenahme dieser Daten können Primer für eine RT-PCR entworfen werden, um die vollständigen Sequenzen von amplifizierten cDNAs mit den Mitgliedern der Astacin-Familie vergleichen zu können. Auf der Basis vollständiger Sequenzen kann man auch den Verwandtschaftsgrad zu anderen Mitgliedern der Familie bestimmen und so beispielsweise die Frage beantworten, ob das Darmsaft-Astacin dem Morphogen von *Drosophila* (Tolloid) oder dem Verdauungsenzym von *Astacus* (Astacin) näher steht.

4.1.4 Aminopeptidasen

Im Mitteldarm von *M. melolontha* kommen sowohl eine freie als auch eine membranständige Aminopeptidase vor [EC 3.4.11.-], die beide eine Molekularmasse von ca. 80 kDa aufweisen und mit dem spezifischen Aminopeptidasen-Inhibitor Bestatin und dem Metalloproteasen-Inhibitor 1,10-Phenanthrolin gehemmt werden können. Diese Hemmbarkeit durch 1,10-Phenanthrolin weist auf die Existenz eines metallischen Cofaktors und passt zu der Tatsache, dass es sich bei allen bislang identifizierten Aminopeptidasen um Metalloproteasen handelt (BRENDA). Es ist denkbar, dass beide Aminopeptidasen eine hohe Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen und sich nur durch die Strukturen unterscheiden, die zur Membranständigkeit führen.

Die eigenen Untersuchungen mit *P. japonica*, *M. hippocastani* und *A. solstitialis*, sowie die Ergebnisse von Bayon (1980) am Nashornkäfer *Oryctes nasicornis* deuten darauf hin, dass das gleichzeitige Auftreten löslicher und membranständiger Aminopeptidasen bei Scarabaeiden weit verbreitet ist (Tab. 4.1). Darüber hinaus ist jedoch speziell über das Vorkommen freier Aminopeptidasen in Verdauungstrakten wenig bekannt (Billingsley 1990; BRENDA). Im Gegensatz dazu ist der membranständige Typ besser charakterisiert. Dieser ist über einen GPI-Anker an der apikalen Epithelmembranen von Mitteldarmzellen fest lokalisiert (Reeck 1999). Neben Insekten findet man diese als Aminopeptidase N (MEROPS ID M01.013) bezeichnete Protease auch bei anderen Invertebraten (Reeck 1999) und Vertebraten (Maroux 1973; Kozak 1982).

Besonderes Interesse in Bezug auf die Fragestellung dieser Arbeit erlangt diese Protease deshalb, weil sie neben einem Transmembran-Glycoprotein der Cadherin-Familie als Rezeptor für die insektiziden BT-Toxine nachgewiesen worden ist. Eine Übersicht hierüber bietet Schnepf (1998).

Als Ausgangsmaterial solcher Rezeptorstudien werden in der BT-Forschung sog. BBMV verwendet (s. Kap. 2.2.6), bei denen es sich um Membranvesikel aus dem Mikrovillisaum der Mitteldarm-Epithelzellen handelt, d. h. der interessierende apikale Membranbereich wird untersucht. BBMV kamen auch bei den folgenden Untersuchungen zur Charakterisierung der Membranständigkeit der Aminopeptidase zum Einsatz:

Gemäß Hooper (1988) ist es durch den Einsatz spezifischer Detergenzien möglich, eine Vorhersage über die Art der Verankerung zu treffen, oder zumindest einen ersten Hinweis darüber zu erhalten. Demzufolge können GPI-verankerte Proteine nur durch einige Detergenzien effektiv freigesetzt werden, worunter CHAPS, Octylglucopyranoside und Natriumdesoxycholat fallen. Bei letzterem wurde ein solcher Effekt nachgewiesen: Die Aminopeptidase ließ sich in Lösung bringen.

Zur Überprüfung dieses Hinweises, dass die Aminopeptidase durch einen GPI-Anker an der apikalen Epithelmembran verankert ist, wurde mit der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) [EC 3.1.4.10] ein Enzym eingesetzt, das die Verankerung spezifisch löst und den Proteinteil unversehrt lässt, wodurch dessen Aktivität weiterhin lokalisiert werden kann. Die Existenz einer solchen Verankerung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies könnte aus sterischen Gründen fehlgeschlagen sein (Sterchi 1999). Zudem könnte hier ein anderer Verankerungstyp vorliegen, etwa über eine Fettsäurekette (Myristyl-Anker) oder eine Prenylgruppe (Farnesyl-Anker), oder es handelt sich hierbei um ein integrales Membranprotein (Alberts 1995). Ein Blick in die Datenbank BRENDA zeigt jedoch, dass solche Verankerungen bei Aminopeptidasen bislang nicht identifiziert werden konnten.

4.1.5 Proteasen weiterer mechanistischer Klassen

Cysteinproteasen [EC 3.4.22.-] und Aspartatproteasen [EC 3.4.23.-] konnten mit den hier angewendeten biochemischen Methoden nicht identifiziert werden. Da Cysteinproteasen normalerweise in leicht sauren Darmsäften, etwa beim Kartoffelkäfer *L. decemlineata* oder bei *Acanthoscelides obtectus*, gefunden werden (Reeck 1999), nicht aber bei den alkalischen Darmsäften der Scarabaeiden (McGhie 1995; Terra 1988), war das Vorkommen einer Cysteinprotease im Darmsaft von *M. melolontha*, der einen pH-Wert von 8,0 besitzt (Franken 1994; Wagner 2000), auch nicht zu erwarten. Dies gilt auch für Aspartatproteasen, um so mehr als deren Aktivitätsbereich bei noch tieferen pH-Werten liegt (BRENDA).

4.1.6 Multiple Aktivitäten

Die Zusammensetzung der Proteasen von *Costelytra zealandica* (Scarabaeidae), die von Christeller (1989) analysiert wurde, dient als geeignete Referenz, das Spektrum und die Anzahl der Proteasen bei verschiedenen Arten zu vergleichen. Sowohl im Darmsaft von *C. zealandica* wie von *M. melolontha* fehlen Cystein- und Aspartatproteasen, es kommen aber mehrere elastaseartige und trypsinartige Serinproteasen vor (Tab. 4.1). Allerdings unterscheiden sich die Molekularmassen der Trypsine (23 und 28 kDa bei *C. zealandica* statt 18, 56 und 63 kDa bei *M. melolontha*). Zudem wurde bei *C. zealandica* eine chymotrypsinartige Protease und eine 43 kDa-Carboxypeptidase nachgewiesen. Aussagen über Aminopeptidasen und Astacine wurden für *C. zealandica* leider nicht getroffen.

Die Beobachtung multipler Isoformen des gleichen Protease-Typs ist bei Insekten nicht ungewöhnlich (Reeck 1999). Baker (1981) beschrieb zwei trypsinartige und vier chymotrypsinartige Serinproteasen bei *Attagenus megatoma*. Multiple elastaseartige Serinproteasen wurden für mehrere Insektengruppen beschrieben, u. a. bei Lepidopteren (Valaitis 1995). Diese Vielfalt könnte auf dem Vorkommen von Multigenfamilien im Insektengenom beruhen (Davis 1985; Peterson 1994; Gatehouse 1997). Solche Multigenfamilien bieten einen evolutiven Vorteil, da es dem Insekt durch eine variable Genexpression ermöglicht wird, mit einer großen Auswahl pflanzlicher Protease-Inhibitoren fertig zu werden, die eigentlich vor Fraßschäden schützen sollen (Lam 2000). Unterschiedliche genetische Isoformen können weiterhin durch posttranslationale Modifikationen wie Glycosylierungen, Phosphorylierungen etc. in ihrer Vielfalt erweitert werden.

4.1.7 Vergleich der untersuchten Scarabaeiden-Darmsäfte

Der Vergleich von Darmsäften verschiedener Entwicklungsstadien, Populationen und Fütterungszuständen von *M. melolontha* zeigte große Übereinstimmungen beim Vorkommen oder Fehlen bestimmter Protease-Klassen, deren Substratspezifitäten und Molekularmassen. Dies gilt in erster Linie für die identifizierten trypsin- und elastaseartigen Serinproteasen, die Aminopeptidasen und, dem Vorbehalt, dass nur bei *M. melolontha* eingehendere Untersuchungen durchgeführt wurden, auch für die astacinartigen Metalloproteasen (Tab. 4.1). Weitere Gemeinsamkeiten würden sich ergeben, wenn die nicht nachgewiesenen chymotrypsinartigen, sowie Cystein- und Aspartatproteasen in der Tat nicht vorkommen.

Da zwischen Larven und Käfern keine qualitativen Unterschiede bei den Protease-Aktivitäten nachgewiesen werden konnte, kann man vermuten, dass deren Expression unabhängig vom Entwicklungsstadium erfolgt. Dies ist deshalb erstaunlich, da beide ein völlig unterschiedliches Nahrungsspektrum besitzen. Als Gegenbeispiel lassen sich einzelne Trypsin-Gene bei *Aedes* anführen, deren Expression durch den Juvenilhormon-Titer oder durch die Nahrungsaufnahme induziert werden (Reeck 1999).

Der qualitative Vergleich der Protease-Aktivitäten zwischen hungernden und gefütterten Tiergruppen zeigte ebenfalls keine Unterschiede. Dies ist auf die Langlebigkeit der Invertebraten-Verdauungsenzyme zurückzuführen (Reeck 1999), wodurch eine Aussage über die Exprimierung einzelner Aktivitäten aufgrund von Schwankungen im Nahrungsangebot nur schwerlich zu treffen ist. Quantitative Aussagen können jedoch getroffen werden, wenn sich z. B. einzelne Aktivitäten beim Füttern nach einer Hungerperiode erhöhen (pers. Mitteilung von W. Stöcker). Von Interesse ist solch eine Abhängigkeit auch dann, wenn man Proteasen aus dem Darmsaft in möglichst hoher Konzentration isolieren möchte. Ein solcher Zusammenhang konnte jedoch bei *M. melolontha* nicht beobachtet werden.

Größere Unterschiede bezüglich des Vorkommens, der Anzahl und der Molekularmassen einzelner Proteasen waren erst beim Vergleich unterschiedlicher Arten zu beobachten. Am deutlichsten wurde dies beim Vergleich von *M. melolontha* mit *P. japonica*. In Hinblick auf den Abbau des Cry8C-Toxins und die unterschiedliche Sensitivität beider Arten kann aufgrund der durchgeführten Untersuchungen folgendes ausgesagt werden:

Bei *M. melolontha* gibt es keine Serinprotease-Typen, die bei *P. japonica* nicht auch vorkommen. Somit gibt es keine verdächtige Aktivität, die exklusiv für den Abbau des Toxins zu Fragmenten <10 kDa in Frage käme. Allerdings kämen für die Fragestellung die quantitativen Unterschiede einzelner spezifischer Aktivitäten in Betracht, die zwischen den Arten beobachtet wurden.

Hinzu kommt die Frage, ob mit den unterschiedlichen Molekulargrößen weitere Funktionen verbunden sind, die Auswirkungen auf die Spezifität der jeweiligen Protease hat. Bemerkenswert ist beispielsweise, dass die verschieden großen elastaseartigen Serinproteasen bei verschiedenen Substraten völlig unterschiedliche Aktivitäten zeigten (Abb. 3.19A, B).

Darüber hinaus konnte erst bei den proteolytischen Untersuchungen mit Cry8C geklärt werden, ob die bei *P. japonica* fehlenden, bzw. nicht eindeutig zuzuordnenden caseinolytischen Aktivitäten, die im Maikäferdarmsaft bei 14, 18 und 23 kDa liegen, einen Einfluss auf den unterschiedlichen Toxinabbau haben (Kap. 4.3).

4.2 Redoxpotential

4.2.1 Allgemeines

Redoxpotentialmessungen bei Insekten werden in der Regel mit Mikroelektroden oder Indikatorsubstanzen durchgeführt (Duspiva 1936; Waterhouse 1951). Die letztere Methode konnte aufgrund der Braunfärbung der Scarabaeiden-Darmsäfte nicht angewendet werden.

Das gemessene Redoxpotential reflektiert die Netto-Elektronenverfügbarkeit aus der Summe aller Oxidations- und Reduktionsprozesse, sowie die Stärke und Konzentration aller beteiligten oxidierenden und reduzierenden Agenzien. Die Komplexität und die Dynamik von diesen nicht im Gleichgewicht befindlichen Redoxreaktionen in Gemischen macht es schwierig, den Beitrag einzelner Komponenten/Halbreaktionen zu analysieren (Johnson 1996).

Wie reagieren Proteasen auf eine künstliche Veränderung des Redoxpotentials?

Untersuchungen von Johnson (2000) haben gezeigt, dass mit Ausnahme von Cysteinproteasen die Aktivitäten aller anderer Protease-Klassen *in vivo* bei einer Veränderung des Redoxpotentials unverändert bleiben (Johnson 2000). Begründet wird dies mit den jeweiligen katalytischen Mechanismen. Dies konnte durch eigene Untersuchungen bestätigt werden, da sich die Bandenmuster der Proteasen in Zymogrammen mit reduzierten oder oxidierten Proben nicht unterschieden. Eine Unempfindlichkeit der Darmsaft-Proteasen gegenüber reduzierenden Agenzien wie DTT oder β -Mercaptoethanol, die in vergleichbaren Studien eingesetzt werden (Christeller 1996; Johnson 2000), war bei den *in vivo* vorherrschenden reduzierenden Bedingungen von vornherein zu erwarten.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Anhebung des Redoxpotentials durch Fe^{3+} führte ebenfalls nicht zu Artefakten. Vielmehr dienen anorganische Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Fe^{3+} , Sulfat und CO_2 bei vielen humivoren Makroinvertebraten natürlicherweise dazu, anaerobische mikrobielle Prozesse aufrecht zu erhalten (Benz 1998; Lee 1971; Garnier-Sillam 1995; Schachtschnabel 1998).

4.2.2 Ursachen für die Entstehung eines niedrigen Redoxpotentials und Beurteilung, welche Faktoren bei *M. melolontha* zutreffen könnten

Im Gegensatz zum pH-Wert, der über Protonenpumpen und Carbonatsekretion gesteuert wird (Dow 1986; Karrowe 1993), kommen für die Entstehung und Aufrechterhaltung des Redoxpotentials in Insekten-Darmsäften vielfältige Ursachen in Frage, die noch längst nicht alle vollständig aufgeklärt oder gar identifiziert sind (Christeller 1996). Hierzu zählt die Abhängigkeit von äußeren Einflüssen oder intrinsische Faktoren wie die endogene Bildung reduzierender Agenzien oder der Einfluss des pH-Werts. Als weitere Ursache kommt ein niedriger Sauerstoffpartialdruck im Darmsaft in Betracht, der durch endogene Oxidasen

(Johnson 2000), die Autooxidation von Chinonen (Johnson 1996; Appel 1990) oder durch mikrobielle Respiration zustande kommt (Veviers 1982; Johnson 2000).

a) Abhängigkeit von äußeren Faktoren

Hierzu zählt die Aufnahme redoxaktiver Nahrung wie Pyruvat, Ascorbinsäure, Vitamin E, Flavonoide, Carotinoide, Amine, Aminosäuren (v. a. Cystein), Thiole, Tannine und Phenole/Chinone (Larson 1988; Shahidi 1992). Die Stärke des Redoxpotentials bei Lepidopteren-Darmsäften hängt hauptsächlich von der Aufnahme dieser Pflanzeninhaltsstoffe ab (Johnson 1996).

Als besonders effektiv erwiesen sich hierbei Hydroxychinone wie Juglon (- 160 mV), während o-Dihydroxyphenole wie Kaffeesäure, sowie die o. a. Stoffe geringe bis keine Einflüsse bei Tests mit Lepidopteren-Larven zeigten (Johnson 1996).

Eigene Biotests, in denen das milde Oxidationsmittel Fe^{3+} gefüttert wurde, haben gezeigt, dass das Redoxpotential von *M. melolontha* ebenfalls für einen definierten Zeitraum künstlich verändert, hier angehoben, werden kann. Andererseits führen unterschiedliche Nahrungsbestandteile und Fütterungszustände zu keiner Veränderung des Redoxpotentials. Eingehendere Untersuchungen könnten die Frage klären, inwieweit bestimmte Modellsubstanzen an der Ausbildung des Redoxpotentials beteiligt sind. Aus den in f) genannten Gründen geht jedoch hervor, dass die Hauptursache eine andere ist.

b) Endogene Oxidasen

Der pH-Wert des Darmsafts liegt mit 8,0 in einem für Oxidasen (Peroxidasen, Phenoloxidasen) optimalen Bereich (Johnson 1996; siehe BRENDA). Als Teil des Immunsystems bei Insekten sind hier v. a. die Phenoloxidasen interessant, da sie nicht nur in Verbindung mit Hämocyten in der Hämolymphe stehen, sondern auch azellulär vorkommen können, wodurch Immunreaktionen in anderen Kompartimenten, also auch dem Mitteldarm, möglich werden (Brey 1998; Gorman 1996; Felton 1989, 1991).

In diesem Zusammenhang steht auch die Frage nach der Ursache für die Braunfärbung des Darmsafts: Durch die Aktivität von Phenoloxidasen können u. a. Melanine entstehen, chinoide Verbindungen, die durch die Oxidation von Dopa oder Dopamin entstehen. Da diese Enzyme auch in Darmsäften nachgewiesen worden sind (Felton 1989, 1991) besteht die Möglichkeit, dass die Braunfärbung von Darmsäften auf die Anreicherung solcher oder ähnlicher Reaktionsprodukte zurückzuführen ist (Johnson 1996).

Diese Möglichkeit ist auch dann richtig, wenn endogene Phenoloxidasen gar nicht im Spiel sind, sondern die chromogenen Chinone, oder andere Pigmente, bereits Bestandteile der Nahrung sind. Die Braunfärbung von aufgeschnittenem Obst (Ben-Shalom 1977) an Luftsauerstoff, die zur Bildung von Chinonen führt, mag dies illustrieren.

Daneben gelten Metallsulfide, Proteinkomplexe mit degradierten Carotinoiden und Chlorophyllen, sowie mercapto-phenolische Radikalkomplexe als mögliche Verursacher dieser Braunfärbung (Appel 1990, 1995).

Aufgrund der eigenen Untersuchungen muss jedoch das Vorkommen größerer Mengen an Phenoloxidasen im Darmsaft aus zwei Gründen bezweifelt werden: (1) Trotz der für das Enzym günstigen oxidativen Bedingungen während der Substratmessungen und den

gegebenen Voraussetzungen¹ zur Aktivierung einer hypothetischen Prophenoloxidase konnte im Vergleich zur Hämolymphe nur eine minimale Reaktion beobachtet werden. (2) Ein Blick in die Datenbank (BRENDA) zeigt, dass Phenoloxidasen durch reduzierende Agenzien gehemmt werden. Wie sollte demnach eine Aktivität unter reduzierenden Bedingungen in situ zustande kommen? Eine geringe Aktivität könnte dafür sprechen, dass diese exogenen Ursprungs ist und über die Nahrung in den Darm gekommen ist (Appel 1990).

c) Autooxidation der Chinone

Dieser Vorgang findet in alkalischen Milieus statt, genauer gesagt bei pH-Werten, die höher liegen als die pK-Werte der Chinone, d. h. > 8,5 (Appel 1995). Hierbei entstehen eine Reihe reaktionsfreudiger Produkte wie Superoxid-Anionen, Hydroxyl-Radicale, H₂O₂ etc., die durch ihre alkylierenden, Protein-fragmentierenden und polymerisierenden Eigenschaften eine Reihe negativer Folgen (Qualitätsminderung der Nahrung, Zellschäden, oxidativer Stress, etc.) haben (Felton 1989, 1992, 1993; Bi 1994; Hanham 1983). Von der eingehenden Fragestellung von Interesse ist dabei jedoch, dass hierbei auch starke Elektronendonatoren entstehen, die bei einem gleichzeitigen Mangel an Elektronenakzeptoren einen Elektronenüberschuss verursachen, wodurch das Redoxpotential abgesenkt wird (Johnson 1996).

Da der pH des Darmsafts unterhalb der genannten pK-Werte liegt dürfte das geschilderte Szenario auszuschließen sein.

d) Bedeutung des pH-Werts

Neben dem eben geschilderten Zusammenhang lässt sich die Abhängigkeit des Redoxpotentials vom pH-Wert auch durch die Nernst'sche Gleichung ausdrücken:

$$E = E_0 - 0,059 \text{ pH} - \frac{0,059}{n} \log \frac{[red]}{[ox]}$$

(E = gemessenes Potential; E₀ = Standardpotential; n = Anzahl der Elektronenübergänge; Gültigkeit für 25°C)

Ein Anstieg des pH-Wertes um eine Einheit senkt demnach das Redoxpotential um 59 mV. Mit pH 8,0 liegt der Darmsaft von *M. melolontha* knapp unterhalb der pK-Werte der Phenole und könnte hierdurch – aber auch durch die stark reduzierenden Bedingungen - vor den schädlichen Oxidationsreaktionen der Pflanzeninhaltsstoffe geschützt sein (siehe Kap. 4.2.2c).

¹ Prophenoloxidasen (PPO) werden in der Regel durch Clip-Serinproteasen (Ben-Shalom 1977; Gorman 2001) aktiviert; um solche könnte es sich auch bei zwei der trypsinartigen Proteasen des Darmsafts handeln, die aufgrund ihrer hohen Molekularmassen neben ihrer katalytischen Funktion auch Domänen besitzen, die bei Kontakt mit Pathogenen oder O₂ zu einer Aktivierung der PPO führen (Jiang 1998; Gorman 2001).

e) Endogene Bildung reduzierender Agenzien

Hierzu zählt die Bildung endogener Thiole (Ritter 1961). Bei der Kleidermotte *Tineola bisselliella* wandelt eine Lyase Cystein-Reste von Nahrungsproteinen in Schwefelwasserstoff um (Yoshimura 1988). Der offensichtliche Zweck dieses Vorgangs besteht darin, im Darmsaft stark reduzierende Bedingungen zu schaffen, die es erlauben, die Disulfidbrücken der keratinreichen Nahrung (Wolle, Stoffe) zu brechen, um damit die Verdauung zu erleichtern (siehe hierzu Kap. 4.2.3).

Die Existenz eines solchen Mechanismus bei *M. melolontha* kann zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch spricht folgende Beobachtung dagegen: Reduzierende Milieus, die durch redoxaktive Stoffe kontrolliert werden, zeigen bei Kontakt mit Luftsauerstoff kaum eine Veränderung. Hierzu zählen auch Thiol-Agenzien wie β -Mercaptoethanol und DTT (siehe auch Kap.3.4.3), die im Gegensatz zu O_2 -kontrollierten Systemen ihr niedriges Redoxpotential halten (Kappler 2002). Dies steht jedoch im Widerspruch zum beobachteten Anstieg des Redoxpotentials bei O_2 -Kontakt während der Darmsaft-Extraktion (Abb. 3.26, Balken 3 u. 4).

f) Mikrobielle Respiration

Als Hauptursache für die Ausbildung des niedrigen Redoxpotentials bei *M. melolontha* kommt der niedrige O_2 -Partialdruck aufgrund mikrobieller Respiration in Betracht. Diesen Schluss muss man aufgrund der folgenden Untersuchungs-Ergebnisse von Dr. Michael Friedrich (MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) und Dr. Andreas Brune (Universität Konstanz) ziehen: Im Darmsaft von *M. melolontha* wurden signifikante Mengen von Methan, Wasserstoff und Acetat (10 mM) nachgewiesen (pers. Mitteilung von Friedrich), typische Fermentationsprodukte, die unter anaeroben Bedingungen angereichert werden. Einen Überblick über die katabolen Prozesse des Zelluloseabbaus gibt Abb. 4.1. Die Darmphysiologie von *M. melolontha* gleicht in diesen Punkten denen anderer Scarabaeiden-Larven wie dem humivoren Rosenkäfer *Pachnoda ephippiata* (pers. Mitteilung von Brune) und dem xylophagen Nashornkäfer *Oryctes nasicornis* (Bayon 1980), sowie anderen herbivoren Insekten und sogar den Ruminantia (Hungate 1966; Murray 1976; Bayon 1980b). Die Kernaussage hierbei lautet, dass aufgrund mikrobieller Aktivität zunächst der als Elektronenakzeptor dienende elementare Sauerstoff verbraucht wird. Daran schließen sich typische Gärprozesse wie die Methano- und Acetogenese an. Die hierfür verantwortlichen Mikrobiota werden derzeit von Brune und Friedrich charakterisiert. Die in Betracht kommenden Darmbakterien wurden bei *Melolontha* (Couturier 1961) und anderen Scarabaeiden (Wiedemann 1930; Bayon 1980) bereits beschrieben.

Die O_2 -Abhängigkeit des Redoxpotentials erklärt den in dieser Arbeit beobachteten sprunghaften Potential-Anstieg des Darmsaft nach Extraktion und Kontakt mit dem Luftsauerstoff. Hierdurch wird der Mangel an Elektronenakzeptoren beseitigt, der Elektronenüberschuss wird abgebaut und das Redoxpotential erhöht sich (Johnson 1996).

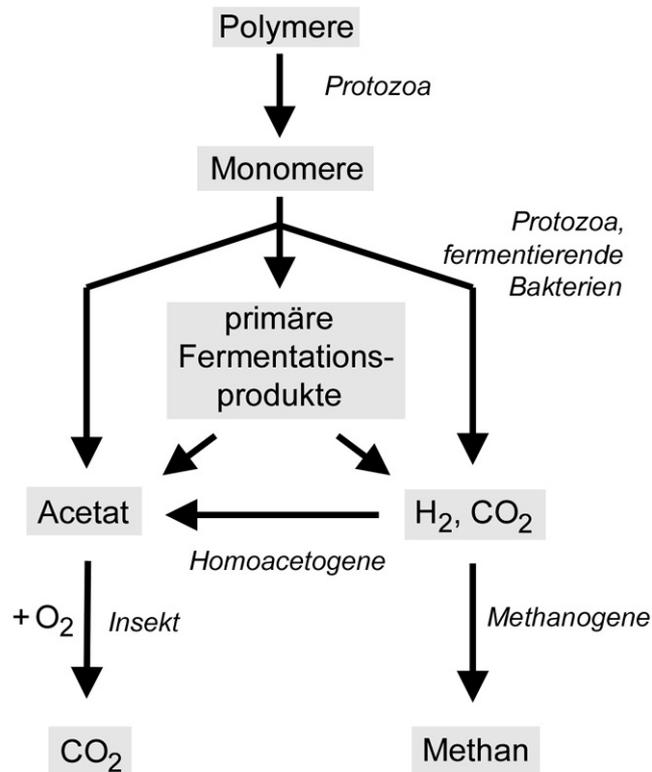


Abb. 4.1 Klassisches Modell der Abbauprozesse von Cellulose und Hemicellulose bei Termiten (Quelle: Homepage von Andreas Brune)

Die Erkenntnis, dass der O_2 -Partialdruck an der Ausbildung der reduzierenden Bedingungen beteiligt ist, wird durch morphologische Betrachtungen weiter unterstützt: Die larvalen Darmsäfte verschiedener Scarabaeiden-Arten werden von Entwicklungsstadium zu Entwicklungsstadium immer reduzierender (siehe eigene Ergebnisse bei *M. melolontha* und *P. japonica*; *Pachnoda ephippiata* (pers. Mitteilung von Brune)). Dies kann mit der damit verbundenen Größenzunahme des Darmvolumens erklärt werden: Während aufgrund der Versorgung des Darms mit Tracheen O_2 in der Darmperipherie bis in eine Tiefe von 50-200 μm diffundiert (Brune 1998) bleibt das Zentrum aufgrund der respiratorischen Aktivität der Darmmikrobiota anoxisch. Mit zunehmendem Wachstum verändert sich das Verhältnis beider Anteile insofern, als sich der zentrale Bereich immer stärker auswirkt, d. h. das Gesamtpotential sich immer weiter diesem annähert.

Der oxidierende Einfluss der Tracheen spiegelt sich übrigens auch im hohen Redoxpotential der Hämolymphe wieder (Abb. 3.26).

4.2.3 Wozu braucht *M. melolontha* ein niedriges Redoxpotential?

M. melolontha könnte die stark reduzierenden Bedingungen dazu benötigen, die pflanzliche Nahrung optimal zu verwerten. Hierfür spricht die generelle Beobachtung bei Insekten, dass in dem Darmabschnitt, der für den proteolytischen Abbau der Nahrung eine zentrale Rolle spielt, nämlich der Mitteldarm, stets niedrigere Redoxpotentiale gefunden werden als in anderen Abschnitten (Johnson 1996b); so auch in diesen Untersuchungen.

Für die Extraktion von Pflanzenproteinen eignen sich v. a. Darmsäfte mit reduzierenden (Appel 1990) und/oder alkalischen Bedingungen (Felton 1991). Letzteres findet man v. a. bei Lepidopteren (Reeck 1999). Hiermit ist allerdings die Gefahr der Autooxidation der Chinone verbunden (siehe Kap. 4.2.2c). Die Ausbildung eines niedrigen Redoxpotentials umgeht dieses Problem und verbessert zudem die Aufnahme von Lipiden (Turunen 1979). Diese Strategie, die schädliche Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen zu minimieren, ist allerdings bei Insekten nicht weit verbreitet (Johnson 1996b). Dies mag daran liegen, dass oxidierende Bedingungen vorteilhaft bei der Abwehr von Insektenviren sind (Felton 1990; Keating 1988, 1989). Welche physiologischen Bedingungen sich im Darmsystem in der Evolution nun ausgebildet haben, könnte somit stark vom jeweiligen Selektionsdruck abhängen und könnte die großen Redoxpotentialunterschiede (-200 mV bis + 260 mV) bei selbst nahe verwandten Arten erklären (Appel 1990; Johnson 1996b).

Die Auswirkungen reduzierender Bedingungen auf den proteolytischen Abbau von Proteinen mit intermolekularen Disulfidbrücken wie im Falle der BT-Toxinkristalle im Darmsaft zeigen einige interessante Parallelen zur Darmphysiologie keratinophager Insektenlarven. Hierunter fallen z. B. spezialisierte Lepidopteren wie die Kleidermotte *Tineola bisselliella* (Waterhouse 1951) und die Braune Hausmotte *Hofmannophila pseudospretella* (Christeller 1996), sowie die Speckkäfer *Anthrenus*, *Attagenus* und *Anthrenocerus* ssp. Die Darmsäfte dieser Arten zeigen stark reduzierende Bedingungen (-190 bis -230 mV; Waterhouse 1951, 1952; Christeller 1996), die es ermöglichen, die intermolekularen Disulfidbrücken des Faserproteins Keratin, das in der jeweiligen Nahrung (Wolle, Fell, Haar, Horn, etc.) enthalten ist, aufzubrechen und dadurch die Proteine zu lösen. Erst dadurch wird ein proteolytischer Abbau ermöglicht (Christeller 1994, 1996; Powning 1951; Ward 1975). Auch hier sind leicht bis stärker alkalische Bedingungen zu beobachten, die eine Extraktion unlöslicher Proteine erleichtern (Waterhouse 1951, 1952).

4.2.4 Worin sich der Darmsaft von *P. japonica* unterscheidet

Im Darmsaft von *P. japonica* herrschen oxidierende (L2) bis leicht reduzierende (L3) Bedingungen, also weitaus höhere Redoxpotentiale als bei *M. melolontha*. Trotzdem liegen die Potentiale immer noch niedriger als bei einem an Luftsauerstoff oxidierten Darmsaft. Aufgrund des ähnlichen Nahrungsspektrums (pers. Mitteilung von D. Lopes, Universität der Azoren) und der zumindest ähnlichen Protease-Ausstattung ist dies auf den ersten Blick erstaunlich, kann aber z. B. durch einen potentiell unterschiedlichen Selektionsdruck, wie in Kap. 4.2.3 angesprochen, in der Evolution dieser Art erklärt werden.

Eine weitere denkbare Ursache ist auch hier die o. a. Redoxpotentialdifferenz aufgrund des morphologischen Größenunterschieds der Larven. Mit dieser Hypothese lassen sich nicht nur Larvenstadien einer Art vergleichen, sondern auch Stadien unterschiedlicher Arten mit gleicher Darmmorphologie¹: Drittlarven von *P. japonica* haben ungefähr die Größe von Zweitlarven von *M. melolontha*. Vergleicht man deren Darmsaft-Redoxpotentiale wird deutlich, dass die Größe pro Larvenstadium zur unterschiedlichen Physiologie beider Larvenarten zwar beitragen kann, aber weitere Faktoren dazukommen müssen, da sich die Potentialdifferenz immer noch um mehr als 100 mV unterscheidet (s. Abb. 3.25).

Hierzu könnte eine unterschiedliche Ausstattung von Darmmikrobiota zählen, die ja schließlich aufgrund ihrer o. a. Respirationstätigkeit die anoxischen Bedingungen verursachen. Vergleichende mikrobiologische Untersuchungen an beiden Scarabaeiden könnten Aufschluss über mögliche Unterschiede geben.

¹ Zwischen den beiden Arten wurden keine unterschiedlichen Dimensionen einzelner Darmabschnitte gefunden.

4.3 Abbau des Kristalltoxins von BTJ

4.3.1 Voraussetzungen zum Lösen der Kristalle

Damit es zum Lösen der Protoxinkristalle von *Bacillus thuringiensis* kommt, müssen verschiedene intermolekulare Bindungstypen in den Kristallen überwunden werden (Li 1991). Hierzu zählen hydrophobe und ionische Wechselwirkungen, sowie Disulfidbrücken. Unter stark alkalischen Bedingungen kann dieser Prozess leicht erfolgen. In der Tat ist dies auch der am weitesten verbreitete und in den Untersuchungen an BT am besten verstandene Mechanismus zum Lösen der Kristalle. Vor allem in den Darmsäften der Cry1-empfindlichen Lepidopteren (pH 10 - 12) ist dieses Prinzip verwirklicht (Schnepf 1998).

Im Gegensatz hierzu muss es bei Insektengruppen mit sauren, neutralen, oder nur leicht basischen pH-Werten im Darmsaft andere Erklärungen für all die Fälle geben, in denen die Toxine von BT sich rasch lösen und wirksam werden. Bei dem Chrysomeliden-spezifischen *Bacillus thuringiensis tenebrionis* beispielsweise fehlt dem Protoxin der C-terminale Teil, der hauptsächlich für die Bildung der intermolekularen Disulfidbrücken verantwortlich ist. Daher kann das Lösen in diesem Fall auch im Sauren erfolgen (Franken 1994; Knowles 1993).

In anderen Fällen werden reduzierende Bedingungen als Ursache für die Löslichkeit vermutet, ohne dies jedoch näher zu untersuchen (McGaughey 1998). Da in diesen Veröffentlichungen die Toxine stets wirksam waren, ging man auch nicht weiter auf den Einfluss des Redoxpotentials bei den sich anschließenden proteolytischen Prozessen ein. Bei den eigenen Untersuchungen erwies sich aber gerade die Stärke des Redoxpotentials als entscheidend (Kap. 3.6; Abb. 4.2).

Zum künstlichen Lösen der BT-Kristalle eigneten sich in Laboruntersuchungen auch chaotrope Substanzen, z. B. Salze wie Carbonate, Bromide, Thiocyanate, etc. (Crickmore 1998). Inwieweit diese bzw. Substanzen mit entsprechender Wirkung bei BT in der Realität eine Rolle spielen, ist bislang völlig ungeklärt. Hierzu müsste man die komplexe Ionenzusammensetzung, sowie andere unbekannte Stoffe von Darmsäften analysieren. Den Nachweis, dass niedermolekulare Substanzen beim Lösen der BTJ-Kristalle benötigt werden, lieferte der Inkubationsversuch, in dem der Einsatz von dialysiertem Darmsaft trotz Erhalt der Proteaseaktivitäten nicht zu einem Abbau der Kristalle führte (Abb. 3.37A).

Hilfreich beim Lösen von Proteinen sind auch Detergenzien. Und in der Tat kennt man einige natürliche, deren Mitwirken beim Lösen von BT-Kristallen denkbar wäre. Hierunter fallen u. a. die N-Acyl-Aminosäuren, die in den Darmsäften von Arthropoden weit verbreitet sind (Collatz 1974) und als Biotenside bei der Verdauung der Nahrung, v. a. bei der Emulgierung von Lipiden, eine wichtige Rolle spielen (Collatz 1974). Es handelt sich dabei um von Darmbakterien (Spiteller 2000) gebildete Konjugate aus gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren variabler Länge, die der Nahrung entstammen, und freien Aminosäuren, v. a. Glutamin (Paré 1998). Der bekannteste Vertreter ist Volicitin (N-(17-hydroxylinolenoyl)-glutamin), das nach Fraßschäden durch herbivore Insekten als Elucitor fungiert und eine Kette von Abwehrreaktionen in der Pflanze auslöst (Spiteller 2000). Die Bedeutung der N-Acyl-Aminosäuren wird auch sichtbar in der Verwendung von Mikroorganismen wie *Pseudomonas* und *Xanthomonas* spp., die als patentierte Biotensid-Produzenten in der kosmetischen Industrie eingesetzt werden (Ajimonoto Co 1982). Der Nachweis dieser Substanzen erfolgt in der Regel massenspektroskopisch, was allerdings einen beträchtlichen Aufwand einschließt und im Rahmen dieser Arbeit nicht bearbeitet werden konnte.

Eine ganz andere Möglichkeit, Protoxine aus Kristallen zu aktivieren, besteht im Angriff der ungelösten Kristalle durch Proteasen, die offenbar an deren Oberfläche die Polypeptide prozessieren. Im Falle von Cry3A reicht Chymotrypsin im Mitteldarm dazu aus, das Lösen der Kristalle zu bewerkstelligen (Carroll 1997). Eine solche Beobachtung machte auch Abel (2000) beim Abbau der Cry8C-Kristalle durch Modellproteasen wie Rindertrypsin.

4.3.2 Endogene Proteasen und die Aktivierung des Protoxins

Bei der Aktivierung der Protoxine von *Bacillus thuringiensis* können nicht nur Darmsaft-Proteasen der Zielinsekten eine Rolle spielen, sondern in einigen wenigen Fällen auch endogene Aktivitäten der Bakterien selbst (Biblios 1988; Venkateswerlu 1990). Diese können extra- und intrazellulär in freier Form vorkommen (Biblios 1988; Reddy 1997), oder eng mit den Kristallen assoziiert sein (Reddy 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass diese möglicherweise sogar in den Kristallen integriert sein könnten (Bernhard 1986). Die Prozessierung der Protoxine kann bereits vor der Kristallbildung oder erst beim Lösen erfolgen (Sekar 1987; Bernhard 1986).

Die jeweils vorkommenden Typen bakterieller Proteasen sind von BT-Stamm zu BT-Stamm sehr verschieden. Bislang konnten Metallo-, Serin- und Cysteinproteasen identifiziert werden (Chestukhina 1982, 1980; Bulla 1977; MEROPS Datenbank). Dies ist offenbar davon abhängig, in welcher Form das Protoxin aktiviert werden muss, um im Zielinsekt die maximale Aktivität zu erreichen (Haider 1987, 1989). Dies könnte auch der Grund für die Beteiligung endogener Proteasen an der Aktivierung der Protoxine bei Fällungen sein, in denen die Darm-Proteasen des Zielinsekts nicht ausreichen, um ein geeignetes Toxin herzustellen.

Im Falle von BTJ konnte durch eigene Untersuchungen eine 80 kDa Metalloprotease identifiziert werden, die ebenfalls eng mit den Kristallen assoziiert ist, und die das 130 kDa Protoxin alleine aktivieren kann, sobald die Vorraussetzungen zum Lösen der Kristalle (Kap. 4.3.1) gegeben sind. Bereits Hori (1994) vermutete endogene Proteasen bei BTJ als Ursache für die Prozessierung von 130 zu 65 kDa während des künstlichen Lösens der Kristalle. Das kurzzeitige Auftreten von Zwischenbanden während dieses Prozesses zeigt, dass die Aktivierung nicht in einem Schritt erfolgt, sondern dass vom Protoxin sukzessiv Fragmente von ca. 10 kDa abgespalten werden (Abb. 4.2). Dies wird auch bei anderen BT-Toxinen beobachtet (Schnepf 1998).

Es muss darauf hingewiesen werden, dass BTJ sicherlich noch weitere Proteasen besitzt, die allerdings durch die hier eingesetzten Methoden nicht nachgewiesen werden konnten. Zum einen könnte es sich dabei um Aktivitäten handeln, die in nur sehr geringen Konzentrationen vorliegen und unter die Nachweisschwelle fallen, zum anderen könnten hier Proteasen übersehen worden sein, die aufgrund ihrer Eigenschaften nicht so unempfindlich sind wie Darmsaft-Proteasen (Reeck 1999) und somit nach den teilweise denaturierenden Zymogramm-Bedingungen nicht wieder renaturiert werden konnten. Um diese Fälle mit einzuschließen, wird der Begriff „endogene Proteasen“ fortan im Plural verwendet.

Unter SDS-Bedingungen bauen die endogenen Proteasen Cry8C vollständig zu Fragmenten <10 kDa ab. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass bereits durch die Präsenz von Detergenzien im Darmsaft ein möglicher Resistenzmechanismus vorliegen könnte: Das Insekt könnte dabei die Widerstandsfähigkeit der eigenen und der bakteriellen Proteasen ausnutzen,

unter Detergens-Bedingungen aktiv zu bleiben, und sich so vor Toxinen zu schützen. Durch die Entfaltung der Proteine unter diesen Bedingungen werden interne Schnittstellen im Toxin freigelegt, sodass ein proteolytischer Abbau erfolgen kann. Inwieweit dies bei *M. melolontha* verwirklicht ist, kann erst durch eine Analyse der tatsächlich vorkommenden Biotenside und durch Abbauprobieren mit Cry8C geklärt werden.

Die Beobachtung, dass unter reduzierenden oder chaotropen Bedingungen ein so weitreichender Abbau nicht erfolgt, zeigt, dass hierdurch die Toxine zwar genauso gut gelöst werden können, aber die Entfaltung der Polypeptidketten weniger stark erfolgt und für endogene Proteasen – und nur für diese (s. u.) - relevante interne Schnittstellen geschützt verborgen bleiben. Die Biotests zeigen zudem, dass die so gelösten 65 kDa Toxine ihre Aktivität behalten.

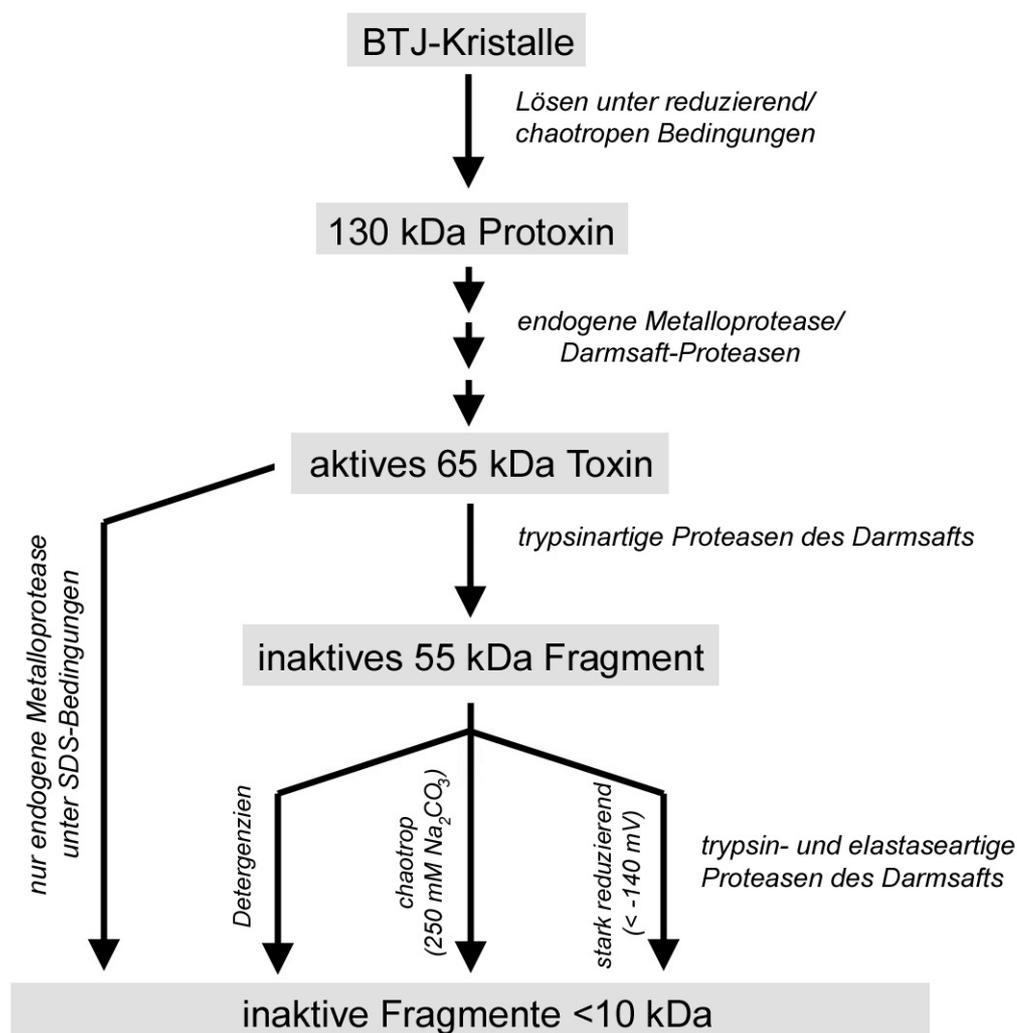


Abb. 4.2 Schema zum Lösen und zur proteolytischen Prozessierung des Kristalltoxins von BTJ.

4.3.3 Der weitergehende Abbau durch die Darmsaftproteasen

Wenngleich die endogenen Proteasen dazu ausreichen, die Aktivierung des Protoxins durchzuführen, muss angemerkt werden, dass hierbei auch Proteasen des Darmsafts beteiligt sein können, sobald die Kristalle vom Insekt aufgenommen worden sind und das Protoxin in Lösung geht. Hierfür spricht die Beobachtung, dass ein Abbau zu 65 kDa in Gegenwart der Darmsaft-Proteasen trotz Hemmung der endogenen Protease durch Phosphoramidon erfolgte, während das Protoxin ohne die Darmsaft-Proteasen weitgehend erhalten blieb (Kap. 3.6.2).

Der nächste Abbauschritt von 65 kDa zu 55 kDa erfolgte in den Darmsäften sowohl des Maikäfers als auch des Japankäfers gleichermaßen durch die jeweiligen trypsinartigen Serinproteasen, die sich zwar in ihrer Aktivität und ihrer Anzahl unterschieden, aber - wie auch das Rinder- und das Krebs-trypsin - zu dem gleichen Produkt führten. Proteolytische Versuche von Abel (2000) mit Rindertrypsin und den ungelösten Kristallen führten zunächst ebenfalls zu diesem Fragment, das dann aber weiter zu Fragmenten zwischen 14 und 20 kDa abgebaut wurde. Letzteren Umstand kann man durch die in diesen Untersuchungen eingesetzte sehr hohe Proteasekonzentration erklären, die generell dazu führt, dass es neben spezifischen auch zu unspezifischen proteolytischen Spaltungen kommt, wodurch auch das sog. Protease-resistente Kernfragment abgebaut wird (Ogiwara 1992; Abel 2000).

Der Abbau von 55 kDa zu Fragmenten <10 kDa hängt, wie Kombinationsversuche mit Inhibitoren und DTT bzw. Na₂CO₃ zeigen, nicht von der unterschiedlichen Zusammensetzung der Proteasen beider Darmsäfte (von *M. melolontha* und *P. japonica*) an sich ab, sondern von der Art und Weise, wie das Toxinsubstrat aufgrund der physiologischen Bedingungen vorliegt. Durch die Einwirkung von wirtseigenen Detergenzien, der Stärke der reduzierenden Bedingungen etc. wird das Toxin wie jedes andere Protease-empfindliche Substrat angreifbarer, indem es entfaltet wird, interne Schnittstellen freigelegt werden, und durch die Aktivität der entsprechenden Proteasen fragmentiert wird (Beynon 1989). So konnte in den eigenen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Proteasen des Maikäfer-Darmsafts unter den Redoxbedingungen des Japankäfers zu einem Abbau des Toxins von 65 kDa zu <10 kDa alleine nicht in der Lage sind. Umgekehrt kann dieser Prozess aber durch die Proteasen von *P. japonica* stattfinden, wenn die reduzierenden Bedingungen des Mitteldarms von *M. melolontha* simuliert werden.

Wenngleich im Mitteldarm von *P. japonica* weitaus weniger reduzierende Bedingungen herrschen als bei *M. melolontha*, führen offenbar die gesamten physiologischen Bedingungen (redoxaktive Stoffe, Biotenside, etc.) in beiden Fällen zu einem Lösen der Kristalle. Beim Japankäfer kommt es danach durch die endogenen Proteasen von BTJ und die eigenen trypsinartigen Serinproteasen nur zu einem Abbau des Protoxins zu 55 kDa. Die stärkeren reduzierenden Bedingungen erlauben beim Maikäfer einen weiteren Abbau zu Fragmenten <10 kDa.

Dass es sich bei all den geschilderten Abbauprozessen um Vorgänge handelt, bei denen Proteasen beteiligt sind, konnte durch den Einsatz von Protease-Inhibitoren eindeutig gezeigt werden. Andere Ursachen wie z. B. eine Fragmentierung von Proteinen aufgrund der möglichen Reaktivität von Chinonen (Kap. 4.2.2 c), können somit ausgeschlossen werden.

Ein wichtiger Punkt, der bislang offen geblieben ist, ist die Frage, warum die Prozessierung des gelösten Toxins (65 kDa) durch den Darmsaft von *M. melolontha* in vitro zu einem stabilen 55 kDa Fragment führt (Kap. 3.6.3), während das Protoxin der nicht vorher gelösten

Kristalle ohne ein nachweisbares Zwischenprodukt bei 65 kDa bzw. 55 kDa direkt zu Fragmenten <10 kDa abgebaut wird. Im Gegensatz hierzu führen bei *P. japonica* beide Ansätze zu 55 kDa.

Möglicherweise spielt hier erneut die 3-D-Struktur des Polypeptids eine Rolle: In den Kristallen könnte das Protoxin eine andere Konformation einnehmen als die gelöste Form. Das Toxin könnte erst nach dem Lösen und der Aktivierung durch endogene Proteasen seine endgültige Konformation einnehmen und erst dann relevante Protease-Schnittstellen intern verbergen. Kommen dieser Konformationsänderung jedoch die Proteasen des Darmsafts zuvor, die diese Stellen erkennen, könnte es zu einem Abbau zu <10 kDa kommen. Da die Bedingungen bei *P. japonica* weniger extrem sind, könnte dieser Prozess nur bei *M. melolontha* stattfinden. Wenn hingegen die Maikäfer-Proteasen erst später auf das fertig umgelagerte 65 kDa Toxin treffen, erfolgt wie bei *P. japonica* nur ein Abbau zu 55 kDa.

An dieser Stelle sei angemerkt, warum nicht auch proteolytische Tests mit unverdünntem Darmsaft durchgeführt wurden, was den natürlichen Bedingungen am nächsten gekommen wäre. Dies hat ausschließlich methodische und arbeitstechnische Gründe: Im Vergleich zum 1:10-verdünnten Darmsaft müssten zehnmal höhere Protease-Inhibitor-, Salz-, Detergens- etc. Konzentrationen eingesetzt werden. Dies könnte man nur durch den Einsatz der ungelösten Agenzien erreichen. Eine homogene Verteilung in den Reaktionsansätzen wäre dann aber nicht mehr gewährleistet. Hinzu kommt, dass sich die proteolytische Reaktionsgeschwindigkeit stark erhöhen würde. Die entsprechend kürzeren Inkubationszeiten (z. T. wenige sec) wären dann nicht mehr exakt einzuhalten, und die Ergebnisse wären wesentlich schwerer zu reproduzieren.

Aufgrund aller vorliegenden Ergebnisse kann man jedoch auf die Vorgänge schließen, die in vivo tatsächlich stattfinden: Wenn es bereits beim 1:10 verdünnten Darmsaft zu einem Lösen der Kristalle und zu einem raschen proteolytischen Abbau zu Fragmenten <10 kDa kommt, kann man sicher sein, dass diese Prozesse im unverdünnten Darmsaft noch schneller ablaufen, da die Konzentrationen sowohl der Faktoren, die zum Lösen der Kristalle führen (Biotenside etc.), als auch der Proteasen weitaus höher liegen. Eine noch weitergehende Entfaltung des Toxins aufgrund der höheren Detergens-Konzentration ist denkbar, wodurch die Fragmente <10 kDa noch weiter abgebaut werden könnten. Diesen erweiterten Abbauschritt dürfte man hingegen bei Einbeziehung der reduzierenden Bedingungen nicht erwarten, da in den Abbaubersuchen in vitro (Kap. 3.6.5) bereits das entsprechende Redoxpotential in vivo (Kap. 3.4) eingestellt wurde. Die höhere Proteasen-Konzentration könnte dazu führen, dass es auch hier zu unspezifischen Spaltungen kommt (s. 2. Abschnitt dieses Kapitels).

4.3.4 Sequenzanalyse der Abbaufragmente

Die Sequenz des Cry8C Protoxins von BTJ (1.160 AS; 130.425 Da) weist 5 konservierte Blöcke zu anderen Käfer-spezifischen BT-Toxinen auf (Ogiwara 1995; siehe Abb. 4.3). Deletionsversuche und Biotests mit *Anomala cuprea* zeigten bei Minami (1995), dass der 5. Block dabei essentiell für die Toxizität ist. Dieser ist Bestandteil von Domäne III, die bei Funktionsuntersuchungen Lepidopteren-spezifischer Toxine als Rezeptorerkennungs- und Bindungsdomäne fungiert (Schnepf 1998).

Durch die N-terminale Ansequenzierung des aktiven 65 kDa Toxins durch Hori (1994) ergibt sich, dass durch die endogenen Proteasen ein N-terminales Fragment (MSP...NAE; 55 AS; 6.289 Da) abgespalten wird. Das aktivierte Toxin sollte nun mindestens eine Größe von

67.645 Da (LSR...PVN; 604 AS) haben, um den 5. Block vollständig miteinzuschließen. Die durch SDS-PAGE ermittelte Molekularmasse liegt jedoch bei 65 kDa (Hori 1994; Abel 2000; Wagner 2001, 2002b) und die Toxizität dieses Fragments wurde in Biotests mit *P. japonica* nachgewiesen (Hori 1994; Kap. 3.7). Dies widerspricht somit den Ergebnissen von Minami (1995), bei dessen Untersuchungen allerdings eine andere Scarabaeidenart verwendet worden ist. Einen Aufschluss über dieses Problem könnte in weitergehenden Untersuchungen eine C-terminale Ansequenzierung des Toxins liefern. Diese Technik wird allerdings nur noch selten durchgeführt (pers. Mitteilung von T. Kempff, Zentrale Proteinanalytik am DKFZ).

```

/translaion="MSPNNQNEYEIIDALSPSTVSDNSIRYPLANDQTNTLQNMNYKDY
LKMTESTNAELSRNPGTFISAQDAVGTGIDIVSTIISGLGIPVLGEVFSILGSLIGLLW
PSNNENVWQIFMNRVEELIDQKILDSVRSRAIADLANSRIAVEYYQNALEDWRKNPHST
RSAALVKERFGNAEAILRTNMGFSFSQTNYESPTLLPTYAQAASLHLLVMRDVQIYGKEWG
YPQNDIDLPHYKEQVSYTARYSDHCVQWYNAGLNKLRGTGAKQWVDYRFRREMNVMLD
LVALFPNYDARIYPLETNAELTREIFTDPVGSYVTGQSSSTLISWYDMI PAALPSFSTLE
NLLRKPDDFTLLQEIRMYTSFRQNGTIEYYNYWGGQRLTLSYIYGSSFNKYSGLVLAGAE
DII PVGQNDIYRVVWTYIGRYTNSLLGVNPVTFYFSNNTQKTYSKPKQFAGGIKTIDSG
EELTYENYQSYSHRVSYITSFEIKSTGGTVLGVVPIFGWTHSSASRNNFIYATKISQIP
INKASRTSGGAVWNFQEGLYNGGPVMLSGSGSQVINLRVATDARGASQRYRIRIRIYAS
DRAGKFTISSRSPENPATYSASIAYTNTMSTNASLTYSTFAYAESGPINLGISGSSRTF
DISITKEAGAAANLYIDRIEFIPVNTLFEAEEDLDVAKKAVNGLFTNEKDALQTSVTDYQ
VNQAAANLIECLSDELYPNEKRMLWDAVKEAKRLVQARNLLQDTGFNRINGENGWTGSTG
IEVVEGDVLFKDRSLRLTSAREIDTETYPTYLYQQIDESLLKPYTRYKLKGFIGSSQDL
EIKLIRHRANQIVKNVPDNLDPVDPVNSCGGVDRCSQQYVDANLALENNGENGNMSS
DSHAFSFHIDTGEIDLNENTGIWIVFKIPTTNGNATLGNLEFVEEGPLSGETLEWAQQQ
EQQWQDKMARKRAASEKTYAAKQAI DRLFADYQDQKLN SGVEMSDLLAAQNLVQSI PY
VYNDALPEIPGMNYTSFTELTNRLQQAWNLYDLQNAI PNGDFRNGLSNWNATSDVNVQQ
LSDTSVLVIPNWNQSQVQFTVQPNYRYVLRVTARKEGVGDGYVIIRDGANQTETLTFN
ICDDDTGVLSTDQTSYITKTVEFTPSTEQVWIDMSETEGVFNIESVELVLEE"

```

Abb. 4.3 Aminosäuresequenz des Cry8C Protoxins von BTJ. Folgende Bereiche sind farbig hervorgehoben: Grün: die fünf konservierten Blöcke (Ogiwara 1995); braun: N-terminale Sequenzanalysen des Protoxins (Hori 1994), des 65 kDa Toxins (Hori 1994) und eines 50 kDa Fragments (Sato 2002, pers. Mitteilung); magenta: N-terminale Sequenzanalyse des 55 kDa Fragments (eigene Arbeit); grau: typische Trypsin-Schnittstellen nach den Aminosäuren K oder R; rot: mögliche C-Termini des 55 kDa Fragments; gelb: mögliche C-Termini des 50 kDa Fragments. Abbildung verändert nach Abel 2000.

Der nach dem 5. Block übrig bleibende C-terminale Teil des Protoxins (TLF...EEE; 501 AS; 56.546 Da) wird durch die endogenen Proteasen ebenfalls abgespalten und wird offenbar rasch zu kleinen Fragmenten abgebaut, da Analysen durch SDS-PAGE keine höhermolekularen Banden zwischen 10 und 56 kDa erkennen lassen.

Das durch die trypsinartigen Serinproteasen des Darmsafts von *M. melolontha* prozessierte 55 kDa Fragment besitzt die N-terminale Sequenz ISAQDA (siehe Kap. 3.6.3). Diese beginnt 8 Aminosäuren hinter der von Hori angegebenen Sequenz des 65 kDa Toxins. Dies ist deshalb bemerkenswert, weil es sich bei dieser Sequenzumgebung um keine typische Trypsinschnittstelle (R oder K in der P1-Position) handelt. Der unterschiedliche N-Terminus könnte folgende Gründe haben: (1) Die trypsinartigen Serinproteasen könnten durch weitere Begleitproteasen des Darmsafts verunreinigt gewesen sein, etwa der Aminopeptidase. Diese

Vermutung konnte allerdings durch begleitende Aktivitätstests (Ergebnisse nicht gezeigt) nicht bestätigt werden. (2) Die trypsinartigen Serinproteasen könnten auch an weiteren, für Trypsine untypischen Schnittstellen im Substrat angreifen (Vgl. Kap. 4.3.3). (3) Unter den endogenen Proteasen von BTJ könnte sich auch eine Aminopeptidase befinden, die trotz des Reinigens des Toxins nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Dies könnte dazu führen, dass Toxinpräparationen unterschiedlicher Forscher (Hori, Abel, Wagner) unterschiedlich stark mit Aminopeptidasen kontaminiert sind und es so zur Bestimmung unterschiedlicher N-Termini des Toxins kommt. Hierfür spricht die Tatsache, dass im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen Abel (2000) eine Aminopeptidasen-Aktivität in Präparationen des gelösten Toxins nachweisen konnte.

Mit der Kenntnis des N-Terminus und der Größe des 55 kDa Fragments lassen sich aus der Cry8C-Sequenz mögliche Trypsinschnittstellen ableiten, an denen der Abbauschritt von 65 kDa zu 55 kDa erfolgen könnte - letzte Klarheit hierüber würde auch hier eine C-terminale Ansequenzierung erbringen. Berechnet man die Länge der Sequenz vom N-Terminus bis zu einer typischen Trypsinschnittstelle, kommen drei Positionen in Frage (Abb. 4.3; Tab. 4.2). In all diesen Fällen liegen diese Schnittstellen zwischen dem dritten und vierten konservierten Block, was dazu führt, dass nur die ersten drei Blöcke im 55 kDa Fragment vertreten sind. In Biotests mit *P. japonica* konnte diesem Abbauprodukt keine Toxizität nachgewiesen werden.

Ein weiteres Fragment, das bei Untersuchungen von Sato (2002, pers. Mitteilung) nachgewiesen wurde, hat eine Molekularmasse von nur 50 kDa, zeigt aber dennoch Toxizität gegen *Anomala cuprea* – wenn auch nur 1/10 so stark wie das 65 kDa Toxin. Dieses Fragment besitzt allerdings einen anderen N-Terminus und enthält im Gegensatz zu dem 55 kDa Fragment auch noch den 4. konservierten Block, was die Toxizität erklären könnte. Durch Berechnung der Fragmentgröße zwischen dem N-Terminus und möglichen Trypsin-Schnittstellen kann diese Aussage überprüft werden (Tab 4.3).

Tab. 4.2 Bestimmung der Größe möglicher Fragmente anhand des bekannten N-Terminus des 55 kDa Fragments und typischer Trypsin-Schnittstellen.

Sequenz	MG (Da)	Anzahl der AS
ISA...ASR	52 236	460
ISA...VMK	54 430	481
ISA...NLR	55 643	493
ISA...DAK	56 228	499
ISA...SQR	56 728	504

Tab. 4.3 Bestimmung der Größe möglicher Fragmente anhand des bekannten N-Terminus des 50 kDa Fragments und typischer Trypsin-Schnittstellen.

Sequenz	MG (Da)	Anzahl der AS
SAA...ISSR	47 951	423
SAA...GSSR	52 685	469

4.4 Biotests

Ein Vergleich der Biotest-Ergebnisse mit anderen Veröffentlichungen (Ohba 1992; Hori 1994; Suzuki 1993, 1994, 1994b) ist schwierig, da jeder Experimentator andere Testbedingungen wählte. Zudem wurden quantitative Untersuchungen v. a. bei *Anomala cuprea* vorgenommen, während bei der vorliegenden Arbeit nur *P. japonica* zur Verfügung stand. Bei der Bestimmung der LD₅₀ bzw. LC₅₀ konnte durch Suzuki (1993, 1994) die bekannte Beobachtung gemacht werden, dass die Empfindlichkeit gegen das Toxin, hier Cry8C, von Larvenstadium zu Larvenstadium abnimmt. Man nimmt an, dass dies mit zunehmenden Protease-Konzentrationen, Veränderung der Membraneigenschaften, steigender Fitness etc. zusammenhängt (Oppert 1999). In Kap. 4.2.2f wurde zusätzlich eine neue Ursache erörtert, bei der das Oberflächen-Volumen-Verhältnis des Mitteldarms und das davon abhängige Redoxpotential eine Rolle spielt.

Bei der Wahl der Toxinmenge, die in den Biotests verfüttert wurde, wurde eine Dosis gewählt, die ungefähr den o. a. LD₅₀-Werten entsprach. Auf die Gabe höherer Mengen wurde verzichtet, um geringe Unterschiede in der Toxizität einzelner Fragmente quantitativ erfassen und statistisch auswerten zu können. Läge beispielsweise bei einem Maximum-Challenge-Test die Mortalität des Kristall- und des 65 kDa Toxin-Ansatzes gleichermaßen bei 100 %, hätten mögliche Unterschiede nicht identifiziert werden können. So konnte gezeigt werden, dass die Kristalle zwar um ca. 20 % effektiver zu sein scheinen als das gelöste Toxin (Kap. 3.7.1), jedoch zeigte der Fischer-Test, dass hier kein signifikanter Unterschied besteht.

Die erhalten gebliebene Toxizität des unter reduzierend-chaotropen Bedingungen gelösten 65 kDa Toxins lieferte den Nachweis, dass die proteolytischen Versuche mit Cry8C in vitro (Kap. 3.6) nicht mit denaturierten Abbauprodukten durchgeführt worden sind, sondern die Fragmente in ihrer natürlichen Faltungsstruktur erhalten geblieben sind. Dies könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass das Toxin an solche Bedingungen angepasst ist, wie sie im Mitteldarm von *P. japonica* herrschen. Eine Entsprechung findet man bei den Cry1-Toxinen, die offenbar an das alkalische Lösen im Mitteldarm von Lepidopteren angepasst sind.

Der Verlust der Toxizität des 55 kDa Fragments ist – wie die Cry8C-Sequenzanalyse (Kap. 4.3.4) zeigt – auf den Verlust der konservierten Blöcke 4 und 5 zurückzuführen. Diese sind bei den Cry1 und Cry3-Toxinen für die Rezeptorerkennung und -bindung verantwortlich (Schnepf 1998) und ihr Fehlen führt offensichtlich auch hier zur Unterbrechung des BT-Wirkungsmechanismus. In diesem Fragment sind allerdings nach wie vor die amphipatischen α -Helices vorhanden (Blöcke 1 und 2), die in die Membran inserieren und zusammen mit weiteren Toxinfragmenten Poren bilden könnten. Kleine Fragmente wie die hier als „Fragmente <10 kDa“ bezeichneten wurden nicht näher analysiert und könnten noch solche Helices aufweisen. Bei einzelnen Cry-Toxinen konnte gezeigt werden, dass selbst solche kurze Polypeptide Toxizität zeigen können (Schnepf 1998). Dies ist aber bei Cry8C und *P. japonica* offensichtlich nicht der Fall.

In diesem Zusammenhang muss die Frage gestellt werden, warum Cry8C bei *P. japonica* überhaupt eine deutliche Wirkung zeigt, obwohl das 65 kDa Toxin im Darmsaft dieser Art zu einem vermeintlich inaktiven 55 kDa Fragment gespalten wird. Die proteolytischen Versuche mit 1:10-verdünntem Darmsaft in vitro haben gezeigt, dass das aktive Toxin nur relativ langsam gespalten wird (Kap. 3.6.3). In vivo dürfte die Halbwertszeit dieses Prozesses im unverdünnten Darmsaft nur wenige Minuten dauern. Diese Zeit könnte aber dennoch ausreichen, dass hinreichend viele Toxinmoleküle Kontakt zu Rezeptoren im Mitteldarmepithel aufnehmen und in die Membran integriert werden. Aus sterischen Gründen

bzw. aufgrund von Konformationsänderungen könnten diese dann vor weiterem Abbau geschützt sein. Eine solche Argumentation wird auch bei Sugimura (1997) nach Untersuchungen von Cry8C an *Anomala* geführt.

Mit der Erhöhung des Redoxpotentials auf das Niveau des Mitteldarms von *P. japonica* sollten nach dem Modell der in vitro-Untersuchungen (Kap. 3.6) bei *M. melolontha* Bedingungen geschaffen werden, bei denen Cry8C vermutlich weniger stark entfaltet wird und daher nicht zu kleinen Fragmenten abgebaut und inaktiviert wird.

Die Verwendung von Fe^{3+} als Oxidationsmittel ist hierzu deshalb gerechtfertigt, weil dieses Metall in recht hohen Konzentrationen (5 % der Oxide) auch in heimischen Böden vorkommt (Kappler 2002; pers. Mitteilung von M. Friedrich, MPI Marburg) und somit auch natürlicherweise von den bodenbewohnenden Engerlingen aufgenommen wird. Allerdings muss angemerkt werden, dass in wässriger Lösung Eisenhydroxyd ausfällt und die Ergebnisse beeinflussen kann. Vor allem ist durch einen fehlenden Biotest – aufgrund des Mangels an Tiermaterial – unklar, ob Cry8C nach Kontakt mit Fe^{3+} noch toxisch ist, oder oxidiert und inaktiviert wurde. In diesem Fall wäre die Ausbringung von Cry8C in Fe^{3+} -haltigen Böden ungeeignet. Als Alternative könnte man Eisenverbindungen testen, die in Lösung bleiben, z. B. komplexiertes Eisen-NTA, Eisencitrat oder Eisenpyrophosphat (Francis 2000). Ob es allerdings entscheidend ist, wie das dreiwertige Eisen vorliegt, ist nach Untersuchungen von Lovley (1996) anzuzweifeln, da bei anaeroben Reaktionen im Mitteldarm terrestrischer Insekten auch oft Huminsäuren an Redoxreaktionen beteiligt sind, wodurch es ermöglicht wird, auch unlösliche Fe^{3+} -Oxide als Elektronenakzeptoren zu nutzen (pers. Mitteilung von M. Friedrich).

In weiterführenden Untersuchungen sollte man auch weitere milde Oxidationsmittel, bzw. schwache Reduktionsmittel testen (s. Tab. 4.4), die die Toxizität von Cry8C nicht/wenig beeinflussen und in Lösung bleiben. Hierfür empfehlen sich v. a. auch Naturstoffe, die möglicherweise sogar in der natürlichen Nahrung von Engerlingen enthalten sind. Hierzu müssten die Futterpflanzen genauer analysiert werden. Johnson (1996) konnte mit einer ähnlichen Fragestellung bei Raupen nachweisen, dass Redoxpotentiale in Mitteldärmen von Insekten durch die Nahrungsaufnahme durchaus verändert werden können.

Tab. 4.4 Zusammenstellung einiger redoxaktiver Stoffe (nach Streitwieser 1986; Fugmann 1997; Johnson 1996)

	Redoxpotential (mV)	redoxaktive Stoffe
starke Oxidationsmittel	> + 1400	MnO_4^- , Ag^{2+}
mittlere Oxidationsmittel	+ 1000 bis + 1400	Cr_2O_7
schwache Oxidationsmittel	+ 500 bis + 1000	Ag^+ , Fe^{3+} , Cu^+
schwache Reduktionsmittel	0 bis + 500	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2S , Quebracho, Tanninsäure, Coumarinsäure
mittlere Reduktionsmittel	- 600 bis 0	Fe , Cr^{2+} , DTT, Ascorbate, Cystein
starke Reduktionsmittel	< - 600	Zn , Na

4.5 Resistenz

4.5.1 Warum ist das Resistenzproblem und die Erforschung der -Mechanismen so wichtig bei BT?

Ein zunehmendes Problem in der biologischen Schädlingsbekämpfung ist die Resistenzentwicklung gegen insektizide BT-Toxine aufgrund eines verstärkten Selektionsdrucks infolge des steigenden Anbaus transgener BT-Pflanzen und der weiteren Ausbringung BT-haltiger Pflanzenschutzmittel im Freiland (Oppert 1997). Für ein wirksames Resistenzmanagement ist es von größter Bedeutung, dass alle auftretenden Resistenzmechanismen identifiziert und charakterisiert werden, um angemessen reagieren zu können, z. B. einer weiteren Ausbreitung der Resistenz entgegenzuwirken, Fehler bei der Applikation von BT-Produkten in der Land- u. Forstwirtschaft zu vermeiden, wirksamere Bekämpfungsstrategien zu entwickeln etc. (McGaughey 1998, 1998b).

Die geringe Wirksamkeit von BTJ innerhalb der Scarabaeiden ist, wie in meiner Diplomarbeit gezeigt werden konnte, kein Einzelfall (Wagner 1999). Dies lässt auf einen artübergreifenden, wirksamen Abwehrmechanismus gegen das Toxin und die ausgekeimten Sporen schließen, wobei das Darmmilieu eine zentrale Rolle spielt. Erklärbar wird dieser Umstand durch die ständige Konfrontation der Engerlinge mit den Mikroorganismen im Erdboden, vor allem vermutlich mit *Bacillus cereus*, der Stammform von *Bacillus thuringiensis*. Daher besteht die Notwendigkeit, dass die Engerlinge im Laufe der Evolution Abwehrmechanismen entwickeln mussten (Schwenke 1974). Als Folge davon könnte es zu einer Kreuzresistenz auch gegen BTJ gekommen sein, ohne dass diese Scarabaeiden je zuvor mit diesem BT-Stamm in Kontakt gekommen wären.

4.5.2 Bedeutung des Resistenzmechanismus bei *M. melolontha*

Um Antworten auf die Frage zu finden, welche Bedeutung der Einfluss der physiologischen Bedingungen in Darmsystemen von Zielinsekten auf den Wirkungsmechanismus von BT hat, beschränkte sich die BT-Forschung bislang auf das Lösen der Kristalle. Dies mag daran liegen, dass sich die Untersuchungen größtenteils auf den wirtschaftlich bedeutsamen Bereich der Lepidopteren-Bekämpfung konzentrieren. Bei dieser Insektenordnung erfolgt das Lösen der Kristalle im alkalischen Darmmilieu, und die Raupen-spezifischen Toxine sind an diese Bedingungen angepasst, d. h. es werden keine internen Schnittstellen freigelegt, die zu einem weiteren proteolytischen Abbau führen. Hinzu kommt, dass die bei Lepidopteren identifizierten Resistenzmechanismen in der Regel auf veränderten Bindungseigenschaften der Membranrezeptoren beruhen. Im Gegensatz dazu sind erst wenige Abwehrmechanismen bekannt, die schon vor der Rezeptor-Toxin-Wechselwirkung greifen. Hierzu gehört das unten beschriebene verlangsamte Lösen der Kristalle durch eine Absenkung des pH-Werts. Einen Resistenzmechanismus wie bei *M. melolontha*, der auf unterschiedlich starken Entfaltungen bereits gelöster BT-Toxine basiert, wodurch unterschiedliche proteolytische Abbauprozesse ermöglicht werden, wurde bislang nicht beschrieben.

Von Bedeutung könnte dieser neue Mechanismus bei der Untersuchung von Arthropodengruppen sein, die wie *M. melolontha* ein stark reduzierendes Darmmilieu besitzen, z. B. bei keratinophagen Insekten wie *Anthrenus*, *Attagenus*, *Anthrenocerus* (Coleoptera), *Hofmannophila pseudospretella*, *Tineola bisselliella* (Lepidoptera) oder einigen

Mallophaga (siehe auch Kap. 4.2). Hierunter fallen einige wirtschaftlich bedeutende Schädlinge wie die Kleidermotte *T. bisselliella* oder der Schaf-Ektoparasit *Bovicola ovis* (Mallophaga), deren Bekämpfung mit BT wünschenswert wäre (Hill 1998; Levot 1995), die Effektivität des Insektizids jedoch noch gesteigert werden muss.

4.5.3 Kommen bei *M. melolontha* weitere Resistenzmechanismen in Frage?

Die Resistenzmechanismen von ehemals BT-sensitiven Insektenarten ist eng mit dem Wirkungsmechanismus des bakteriellen Insektizids verknüpft.

Im folgenden Abschnitt wird diskutiert, welche (weiteren) Resistenzmechanismen bei BT identifiziert worden sind, und welche davon bei *M. melolontha* zusätzlich zu dem identifizierten in Frage kommen.

(1) Die Toxizität des Insektizids ist von der Geschwindigkeit des Lösen der Kristalle im Darm abhängig (Oppert 1997). Ein zu langsames bzw. ein zu geringes Lösen hat eine zu geringe Konzentration des aktiven Toxins zur Folge (Oppert 1999). Hierdurch sind allenfalls subletale Effekte zu beobachten, etwa Fressstopp, längere Larvalentwicklung, reduzierte Fitness etc. (Glare 2000). Wie Untersuchungen an *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera) mit Cry3A zeigen, kann aber auch ein zu schnell gelöstes Toxin ineffektiv sein (Walters 1995). In diesem Fall ist die Dauerwirkung durch das langsame Lösen des Toxins entscheidend. Für die Veränderung der Lösungsgeschwindigkeit kommen physiologische Ursachen wie Änderungen im pH-Wert- oder im Ionenhaushalt in Betracht (Oppert 1999; McGaughey 1998).

Bei *M. melolontha* findet aufgrund der physiologischen Bedingungen ein rasches Lösen der Kristalle statt. Ob eine Verlangsamung dieses Prozesses zu einer Erhöhung der Toxizität führen würde, ist fraglich, da v. a. der anschließende proteolytische Abbauprozess im reduzierenden Darmmilieu entscheidend ist. Erst durch Strategien, die alle beteiligten Faktoren miteinschließen, könnte man den Einfluss dieses Faktors testen.

(2) Bei *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera) konnte nachgewiesen werden, dass eine Präzipitation des Cry1Aa-Toxins durch ein Darmsaft-Protein, TPP-75, erfolgt und die Toxinwirkung verhindert (Milne 1998). TPP-75 bindet an den C-Terminus des Toxins und besitzt elastaseartige Aktivität.

Dieser Mechanismus kann bei *M. melolontha* ausgeschlossen werden, da in proteolytischen Versuchen mit BTJ-Kristallsuspensionen ein Abbau nachgewiesen werden konnte: Ein vor der Proteolyse geschütztes Präzipitat hätte bei der SDS-PAGE zum Nachweis des intakten Toxins bzw. Protoxins führen müssen.

(3) Die Resistenz eines *Plodia interpunctella*-Stammes gegen das Toxin von *B. t. entomocidus* konnte im Vergleich zu sensitiven Stämmen auf eine deutliche Reduzierung der Aktivität einer Serinprotease zurückgeführt werden (Oppert 1997). Da diese für die Aktivierung des Toxins verantwortlich ist, können nur subletale Toxinkonzentrationen im Darm der Raupe entstehen.

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass im Darmsaft des Cry8C-resistenten Maikäfers ein ähnlich rascher Abbau (z. B. von 65 kDa zu 55 kDa) wie beim Cry8C-sensitiven Japankäfer erfolgt, kann dieser Mechanismus ebenfalls ausgeschlossen werden.

(4) Bei *Heliothis virescens* (Lepidoptera) konnte eine Resistenz gegen das Cry1Ab-Toxin nachgewiesen werden, die dadurch entsteht, dass das aktivierte Toxin durch Darmsaft-Proteasen im Vergleich zu sensitiven Stämmen schneller abgebaut wird (Forcada 1996; Ogiwara 1992). Ob dies durch eine erhöhte Aktivität oder durch eine veränderte

Substratspezifität einzelner Proteasen erfolgt, wurde offengelassen. Einen Überblick über ähnliche Untersuchungen gibt Oppert (1999).

Durch die Simulation der physiologischen Bedingungen beider Scarabaeiden-Darmsäfte und der Kombination mit den Darmsaft-Proteasen beider Arten konnte nachgewiesen werden, dass der unterschiedliche proteolytische Abbauprozess nicht wie bei *H. virescens* auf eine Veränderung der Proteasen-Eigenschaften zurückzuführen ist.

(5) In einer Reihe von Fällen konnte gezeigt werden, dass das Aktivitätsspektrum eines Protoxins davon abhängt, in welchem Organismus es aktiviert wird, d. h. es besteht eine Korrelation zwischen Insektenproteasen und Toxinselektivität. Einen Überblick gibt Oppert (1997). Beispielsweise ist das Toxin von *B. t. aizawai* ausschließlich gegen Dipteren wirksam, wenn es in Dipteren-Darmsäften aktiviert worden ist. Andererseits ist es ausschließlich gegen Lepidopteren wirksam, wenn es in Lepidopteren-Darmsäften aktiviert worden ist (Haider 1986). Der Grund hierfür liegt darin, dass durch unterschiedliche Proteasen unterschiedliche Schnittstellen im Protoxin angegriffen werden.

Inwieweit es zwischen *M. melolontha* und *P. japonica* in vivo Unterschiede beim Abbau des 130 kDa Protoxins gibt, konnte aufgrund der Komplexität der beteiligten Faktoren nicht beantwortet werden. Es ist allerdings deutlich geworden, dass das aktive 65 kDa Toxin durch die trypsinartigen Proteasen beider Arten, sowie durch andere Trypsine, gleichermaßen zu 55 kDa abgebaut wird. Unter Vorbehalt sei jedoch angemerkt, dass nur bei dem *M. melolontha*-prozessierten Fragment der N-Terminus bekannt ist.

(6) Ein möglicher Resistenzmechanismus wäre auch durch die Beteiligung des Immunsystems der Insekten denkbar. Zwar wurde dies im Zusammenhang mit BT noch nicht beschrieben, die Abwehr von mikrobiellen Pathogenen im Darmsystem ist jedoch in anderen Fällen von Bedeutung (Gorman 2001). In Kap. 4.2.2b wurde bereits ausgeführt, dass Phenoloxidasen im Mitteldarm vorkommen können (Brey 1998). Diese Enzyme leiten nach der Erkennung bakterieller Lipopolysaccharide oder pilzlicher β -1,3-Glucane eine noch nicht vollständig aufgeklärte Aktivierungskaskade ein, die zu einer Melanisierung von Antigenen führt, wodurch diese immobilisiert und inaktiviert werden (Gorman 2001). Daneben sind weitere Abwehrmechanismen bei Insekten bekannt (Gorman 1996).

Ob das Immunsystem bei der Resistenz von *M. melolontha* eine Rolle spielt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

(7) Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung von BT zu mindern, besteht darin, die Toxine unspezifisch zu binden und sie somit vor der spezifischen Bindung an einen Rezeptor im apikalen Epithel von Mitteldarmzellen abzufangen (Moar 1995). Neben Membranproteinen, die die anschließende Formation von Poren nicht gewährleisten, kommt dabei auch die peritrophische Membran in Betracht, an deren Matrix Proteine immobilisiert werden können (Dettner 1999).

Über diese Möglichkeit der Resistenzbildung, sowie weitere Mechanismen, die in Zusammenhang mit der Rezeptorbindung oder der Membranintegration des Toxins (Übersicht: Oppert 1997; McGaughey 1998; Schnepf 1998; Glare 2000) stehen, kann bei *M. melolontha* nur spekuliert werden. Hierzu müssten eingehendere Untersuchungen durchgeführt werden, die die Bindungseigenschaften von Cry8C bei BBMV des Mitteldarmepithels analysieren. Als häufig genannte Resistenzmechanismen kommen dabei eine reduzierte Bindungsfähigkeit des Toxins an einen modifizierten spezifischen Rezeptor (McIntosh 1991), veränderte Membraneigenschaften etc. in Frage, die dazu führen, dass eine Porenbildung in der Darmwand erschwert bzw. verhindert wird.

4.6 Ausblick

In diesem abschließenden Kapitel sollen Vorschläge erörtert werden, die zu einer wirkungsvollen Bekämpfung des Maikäfers führen könnten.

Hierzu seien zunächst einige Möglichkeiten genannt, BTJ zur Wirkung zu verhelfen:

(1) Unter der Voraussetzung, dass die stark reduzierenden Bedingungen im Mitteldarm von *M. melolontha* die alleinige Resistenzursache ist, könnte man versuchen, anstelle von Fe^{3+} andere milde Oxidationsmittel einzusetzen, um das Redoxpotential des Mitteldarms zu steigern, den Abbau des Toxins zu verhindern und es gleichzeitig nativ zu halten (Kap. 4.4).

(2) Durch Kombination des Cry8C-Toxins mit weiteren Toxinen könnte eine Wirkungssteigerung erfolgen. Bei BT gibt es zahlreiche Beispiele, dass durch die gleichzeitige Verwendung von Kristallen und Sporen (Glare 2000), zusätzlichen Exotoxinen (Glare 2000), mehreren BT-Stämmen (McGaughey 1998), zusätzlichen Insektiziden/Pathogenen (z. B. BTJ u. Nematoden: Koppenhöfer 1997; Tab. 1.1), oder geeigneteren Applikationsverfahren bzw. Formulierungen die Toxizität erhöht oder synergistische Effekte (Glare 2000) erzielt werden können. Besonders vielversprechend ist dies, wenn dabei unterschiedliche Wirkungsmechanismen und Strategien zum Tragen kommen (McGaughey 1998; Schnepf 1998).

Der Buibui-Stamm von BTJ besitzt neben dem Cry-Toxin kein β -Exotoxin, *B. cereus*-artiges Enterotoxin oder Haemolysin wie manch andere BT-Stämme (Glare 2000). Durch Kombination mit solchen Stämmen, beispielsweise *B. t. israelensis* oder *B. t. tenebrionis*, könnte ein solches Toxinspektrum komplettiert werden.

(3) Neben Cry8C sollten weitere Käfer- oder gar Scarabaeiden-spezifische Toxine (Überblick: Glare 2000) weiter untersucht werden. Hierunter fällt Cry3A von *B. t. tenebrionis*, Cry9D von *B. t. japonensis* Stamm N141 (Crickmore 1998; Iizuka 1996) und Cry18A von *Paenibacillus* (früher *Bacillus*) *popilliae* (Zhang 1997). Unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnte es möglich werden, diese Toxine bei *M. melolontha* zur Wirkung zu bringen.

(4) Das Screening von Pathogenen in Maikäferpopulationen sollte verbessert werden. Gerade BT-Stämme stehen häufig nur aufgrund von Zufallsfunden zur Verfügung, da diese in der Natur normalerweise keine Seuchen auslösen, die auffällig werden und zur Ursachensuche Anlass geben (Glare 2000). In Maikäferpopulationen auftretende Pathogene dürften ohnehin wirkungsvoller sein als solche, die typischerweise nur bei verwandten Arten auftreten. Als Strategie zur Isolierung solcher Stämme könnte man Gebiete untersuchen, in denen Maikäferpopulationen vor kurzem zusammengebrochen sind, oder aus unbekanntem Gründen nicht weiter expandieren.

5 Zusammenfassung

Aktivierung und Inaktivierung des Cry8C-Toxins von *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui im Darmsystem von Engerlingen (Scarabaeidae)

Die Kristalltoxine von *Bacillus thuringiensis* wirken mit hoher Spezifität auf Insektenlarven verschiedener systematischer Zugehörigkeit und werden im Rahmen der biologischen Schädlingsbekämpfung eingesetzt. Es sind Fraßgifte, die nach ihrer Aktivierung im Insekten Darm durch Zerstörung des Mitteldarmepithels zum Tod der Larven führen. Unterschiedliche Resistenzmechanismen wurden identifiziert, die zur Inaktivierung der Toxine führen können.

Bacillus thuringiensis japonensis Stamm Buibui (BTJ) zeigt gegen Maikäfer (*Melolontha melolontha* und *M. hippocastani*) und den Junikäfer (*Amphimallon solstitialis*) eine sehr geringe Wirkung, während *Anomala*-Arten und der Japankäfer (*P. japonica*) empfindlich sind.

Zur Identifizierung der Ursachen, die für die unterschiedliche Wirksamkeit verantwortlich sind, wurde in der vorliegenden Arbeit die Darmphysiologie der Larven des BTJ-sensitiven Japankäfers und des resistenten Feldmaikäfers untersucht. Dies führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Das Spektrum der Darmproteasen: Im Darmsaft von *M. melolontha* wurden jeweils drei trypsin- und elastaseartige Serinproteasen, eine Aminopeptidase und zwei weitere Metalloproteasen identifiziert und charakterisiert. Hinzu kommt eine membranständige Aminopeptidase. Im Vergleich zu weiteren Scarabaeiden (*M. hippocastani*, *A. solstitialis*, *P. japonica*) variieren die Anzahl, die Molekularmassen und die Aktivitäten einzelner Proteasen, aber einen qualitativen Unterschied durch weitere Protease-Klassen gibt es nicht.

Bei einer der Metalloproteasen von *M. melolontha* handelt es sich um ein Mitglied der Astacin-Familie. Außerhalb der dekapoden Crustacea ist es die erste identifizierte Protease mit Verdauungsfunktion. Das Vorkommen von Astacin bei weiteren Scarabaeiden ist sehr wahrscheinlich.

2. Das Redoxpotential im Darmmilieu: Im Mitteldarm von *M. melolontha* herrschen weitaus reduzierendere Bedingungen als bei *P. japonica*. Durch mikrobielle Fermentationsprozesse sinkt der O₂-Partialdruck im Zentrum des Mitteldarms im Gegensatz zur Tracheen-nahen Peripherie ab. Durch ein geringeres Oberflächen/Volumen-Verhältnis ist das Redoxpotential des Maikäfer-Darmsafts insgesamt stärker negativ. Zusätzliche Ursachen sind möglich.

Dieses Redoxpotential trägt zur Löslichkeit des 130 kDa Protoxins bei. Auch Detergenzien, wie sie im Darmsaft vorkommen, unterstützen die Lösung des Toxins. Darüber hinaus kann in vitro das Toxin mittels chaotroper Ionen in Lösung gebracht werden. Das gelöste Protoxin wird in vitro von einer mit dem Toxinkristall assoziierten sog. endogenen Metalloprotease von BTJ zum aktiven 65 kDa Toxin prozessiert.

Aus der Kombination dieser Gegebenheiten und entsprechender in vitro und in vivo Versuche mit dem Cry8C Toxin kann für *M. melolontha* folgender Resistenzmechanismus abgeleitet (vorgeschlagen) werden:

Während beim Cry8C-sensitiven Japankäfer das Toxin nur zu 55 kDa weiter abgebaut wird, erfolgt bei *M. melolontha* durch die gleichen trypsinartigen Proteasen ein Abbau zu Fragmenten <10 kDa, weil es durch die stärker reduzierenden Bedingungen zu einer Entfaltung des Toxins kommt, wodurch zusätzlich interne Schnittstellen freigelegt werden.

Das 55 kDa-Fragment, dem die konservierten Blöcke 4 und 5 des 65 kDa Toxins fehlen, zeigt wie die Fragmente <10 kDa keine Toxizität mehr. Cry8C wirkt dennoch bei *P. japonica*, weil dieser Abbauschritt nur langsam erfolgt und das Toxin nach einer Membranintegration vor weiterem Abbau geschützt sein könnte.

6 Literaturverzeichnis

Abel O. (2000): Untersuchungen zur proteolytischen Prozessierung des käferspezifischen Kristalltoxins von *Bacillus thuringiensis* ssp. *japonensis* durch Proteasen. Staatsexamensarbeit an der Fakultät für Biologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Ajimonoto Co., Inc. (1982). Japan Patent Nr. 57.129.696

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (1995): Molekularbiologie der Zelle. VCH-Verlag, 3. Auflage. ISBN 3-527-30055-4

Appel H. M., Martin M. M. (1990): Gut redox conditions in herbivorous lepidopteran larvae. *J. Chem. Ecol.* 16, 3277-3290

Appel H. M., Maines L. W. (1995): The influence of host plant on gut conditions of gypsy moth (*Lymantria dispar*) caterpillars. *J. Insect Physiol.* 41, 241-246

Asano S., Hori H. (1995): Enhancing effects of supernatants from various cultures of *Bacillus thuringiensis* on larvicidal activity of δ -endotoxin against the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Appl. Entomol. Zool.* 30 (2), 369-374

Baker J. E. (1981): Resolution and partial characterization of the digestive proteinases from larvae of the black carpet beetle. In: Current topics in insect endocrinology and nutrition. Plenum Press, New York, 283-315

Barrett A. J., Mavroudis D., Tisdale J., Molldrem J., Clave E., Dunbar C., Cottler F. M., Phang S., Carter C., Okunneff P., Young N. S. Read, E. J. (1998): T cell-depleted bone marrow transplantation and delayed T cell add-back to control acute GVHD and conserve a graft-versus-leukemia effect. *Bone Marrow Transplant.* 21, 543-551

Bayon C. (1980): Volatile fatty acids and methane production in relation of anaerobic carbohydrate fermentation in *Oryctes nasicornis* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Insect Physiol.* 26, 819-828

Bayon C., Etievant P. (1980b): Methanic fermentation in the digestive tract of a xylophagous insect: *Oryctes nasicornis* L. larva (Coleoptera Scarabaeidae). *Experientia* 36, 154-155

Beckett R. P., Davidson A. H., Drummond A. H., Huxley P., Whittaker M. (1996): Recent advances in matrix metalloproteinase inhibitor research. *Drug Discovery Today* 1, 16-26

Ben-Shalom N., Kahn V., Harel E., Mayer A. M. (1977): Catechol oxidase from green olives: properties and partial purification. *Phytochem.* 16, 1153-1158

Berner M., Schnetter W. (2001): Wirksamkeit entomopathogener Nematoden gegen Engerlinge der Maikäfer. *Mitt. DGaaE* 13, 165-167

Bernhard K. (1986): *FEMS Microbiol. Lett.* 33, 261-265

Benz M., Schink B., Brune A. (1998): Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4507-4512

Beynon R. J., Bond J. S. (1989): Practical approach series: proteolytic enzymes: a practical approach. Kapitel XVIII. IRL PRESS, ISBN 0-19-963059-3

Bi J. L., Felton G. W., Mueller A. J. (1994): Induced resistance in soybean to *Helicoverpa zea*: role of protein quality. *J. Chem. Ecol.* 20, 183-198

Biblios M. M., Andrews R. E. (1988): *Can. J. Microbiol.* 34, 740-747

- Billingsley P. F. (1990): Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): partial characterization and post-feeding activity of midgut aminopeptidases. *Archives of Insect Biochem. Physiol.* 15, 149-163
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-54
- Brey P. T., Hultmark D. (1998): *Molecular mechanisms of immune responses in insects.* Chapman & Hall, London.
- Brune A. (1998): Termite guts: the world's smallest bioreactors. *TIBTECH* 16, 16-21
- Bulla L. A., Kramer K. J., Davidson L. I. (1977): Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 130, 375-383
- Carroll J., Convents D., Van Damme J., Boets A., Van Rie J., Ellar D. J. (1997): Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Inverteb. Pathol.* 70, 41-49
- Chestukhina G. G., Zalunin I. A., Kostina L. I., Kotova T. S., Katrukha S. P., Stepanov V. M. (1980): Crystal-forming proteins of *Bacillus thuringiensis*. The limited hydrolysis by endogeneous proteinases as a cause of their apparent multiplicity. *Biochem. J.* 187, 457-465
- Chestukhina G. G., Kostina L. I., Mikhailova A. L., Tyuria S. A., Klepikova F. S., Stepanov V. M. (1982): *Arch. Microbiol.* 132, 159-162
- Christeller J. T., Shaw B. D., Gardiner S. E., Dymock J. (1989): Partial purification and characterization of the major midgut proteases of grass grub larvae (*Costelytra zealandica*, Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Biochem.* 19, 221-231
- Christeller J. T., Markwick N. P., Burgess E. P. J. (1994): Midgut proteinase activities of three keratinolytic larvae, *Hofmannophila pseudospretella*, *Tineola bisselliella* and *Anthrenocerus australis*, and the effect of proteinase inhibitors on proteolysis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 25, 159-173
- Christeller J. T. (1996): Degradation of wool by *Hofmannophila pseudospretella* (Lepidoptera: Oecophoridae) larval midgut extracts under conditions simulating the midgut environment. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32, 99-119
- Collatz K. G., Mommsen T. (1974): Die Struktur der emulgierenden Substanzen verschiedener Invertebraten. *J. Comp. Physiol.* 94, 339-352
- Couturier S. (1961): Recherches anatomiques et histologiques sur l'iléon des Melolonthinae (Coléoptères Scarabéides). *Ann. Epiphyties* 12, 317-346
- Crickmore N. (1998): *Bacillus thuringiensis* toxin gene nomenclature. Web-Seite http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html
- Davis C. A., Riddell D. C., Higgins M. J., Holden J. J., White B. N. (1985): A gene family in *Drosophila melanogaster* coding for trypsin-like enzymes. *Nucleic Acids Res.* 13, 6605-6619
- Dettner K., Peters W. (1999): *Lehrbuch der Entomologie.* Fischer Verlag, ISBN 3-437-25920-2
- Dow J. A. T. (1986): Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* 19, 187-328
- Drum D. E., Vallee B. L. (1970): Differential chemical reactivities of zinc in horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 9, 4078-4086
- Duspiva F. (1936): Die Verwendung der Glaselektrode zur Bestimmung der H⁺-Konzentration im Darmsaft der Kleider- und Wachsmottenlarven. *C.R. Lab. Carlsberg* 21, 167-75

- Ellar D. J. (1994): Structure and mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins and their receptors. *Biocontr. Sci. Technol.* 4 (4), 445-447
- Engel J. (1997): Signifikante Schule der schlichten Statistik. Filander Verlag, ISBN 3-930831-07-4
- Estruch J. J., Warren G. W., Mullins M. A., Nye G. J., Craig J. A., Koziel M. G. (1996): Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5389-5394
- Faloci M. M., Yantorno O. M., Marino H. A., Arcas J. A., Ertola R. J. (1990): Effect of the Media Comosition on the Growth Parameters and Biological Properties of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Delta-Endotoxin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 6, 32-38
- Felton G. W., Donato K., Del Vecchio R. J., Duffey S. S. (1989): Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *J. Chem. Ecol.* 15, 2667-2694
- Felton G. W., Duffey S. S. (1990): Inactivation of baculovirus by quinones formed in insect-damaged plant tissues. *J. Chem. Ecol.* 16, 1221-1236
- Felton G. W., Duffey S. S. (1991) Reassessment of the role of gut alkalinity and detergency in insect herbivory. *J. Chem. Ecol.* 17, 1821-1836
- Felton G. W., Donato K. K., Broadway R. M., Duffey S. S. (1992): Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore. *J. Insect Physiol.* 38, 277-285
- Felton G. W., Summers C. B. (1993): Antioxidant role of dehydroascorbic acid reductase in insects. *Biochim. Biophys. Acta* 1156, 235-238
- Forcada C., Alcacer E., Garcera M. D., Martinez R. (1996): Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31, 257-272
- Francis C. A., Obratsova A. Y., Tebo B. M. (2000) : Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Appl. Environm. Microbiol.*, 543-548
- Franken E. (1994): Wirkungsweise des insektiziden Kristalltoxins von *Bacillus thuringiensis tenebrionis*. Dissertationsschrift, Fakultät für Biologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Fugmann B. (1997): Römpp-Lexikon Naturstoffe. ISBN 3-13-749901-1
- Garcia-Carreño F. L., Dimes L. E., Haard N. F. (1993): Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65-69
- Garnier-Sillam E., Harry M. (1995): Distribution of humic compounds in mounds of some soil-feeding termite species of tropical rain forests: its influence on soil structure stability. *Insects Sociaux* 42, 167-185
- Gatehouse L. N., Shannon A. L., Burgess E. P. J., Christeller J. T. (1997): Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27, 929-944
- Glare T. R., Jackson T. A. (1992): Use of pathogens in scarab pest management. Intercept Ltd., ISBN 0-946707-35-9
- Glare T. R., O'Callaghan M. (2000): *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Wiley, ISBN 0-471-49630-8
- Gorman M. J., Cornel, A. J., Collins F. H., Paskewitz S. M. (1996): A shared genetic mechanism for melanotic encapsulation of CM-Sephadex beads and a malaria parasite, *Plasmodium cynomolgi* B, in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Exp. Parasitol.*, 84, 380-386

- Gorman M. J., Paskewitz S. M. (2001): Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 257-262
- Haider M. Z., Knowles B. H., Ellar D. J. (1986): Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem.* 156, 531-540
- Haider M. Z., Ellar D. J. (1987): Characterization of the toxicity and cytopathic specificity of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein using insect cell culture. *Mol. Microbiol.* 1 (1), 59-66
- Haider M. Z., Ellar D. J. (1989): Functional mapping of an entomocidal delta-endotoxin. Single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. *J. Mol. Biol.* 208, 183-194
- Hanham A. F., Dunn B. P., Stich H. F. (1983): Clastogenic activity of caffeic acid and its relationship to hydrogen peroxide generated during autooxidation. *Mutat. Res.* 116, 333-339
- Harde K. W., Severa F. (1981): *Der Kosmos-Käferführer*. Kosmos-Verlag, ISBN 3-440-04881-0
- Heussen C., Dowdle E. B. (1980): Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102, 196-202
- Hill C. A., Pinnock D. E. (1998): Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the alimentary canal of the sheep louse, *Bovicola ovis*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 72, 9-20
- Höfte H., Whiteley H. R. (1989): Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242-255
- Hooper N. M., Low M. G., Turner A. J. (1987): Renal dipeptidase is one of the membrane proteins released by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem. J.* 244(2), 465-469
- Hooper N. M., Turner A. J. (1988): Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Differential solubilization by detergents can predict a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *Biochem. J.* 250(3), 865-869
- Hori H., Suzuki N., Ogiwara K., Himejima M., Indrasith L. S., Minami M., Asano S., Sato R., Ohba M., Iwahana H. (1994): Characterisation of Larvicidal Toxin Protein from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* Strain Buibui Specific for Scarabaeid Beetles. *J. Appl. Bacteriol.* 76 (4), 307-313
- Hungate R. E. (1966): *The rumen and its microbes*. Academic Press, New York.
- Iizuka T., Sasaki J., Asano S., Yamamoto T. (1996): Screening and cloning of novel toxin genes from *Bacillus thuringiensis* strains encoding a highly scarabe-cidal protein. Tagungsband-Abstract in 29th annual meeting and third international colloquium on *Bacillus thuringiensis*. Cordoba, Spain: Society for Invertebrate Pathology, 38
- Inagaki S., Miyasono M., Ishiguro T., Takeda R., Hayashi Y. (1992): Proteolytic processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 in insensitive insect, *Spodoptera litura*: unusual proteolysis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 64-68
- Jiang H., Wang Y., Kanost M. R. (1998): Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: A bacteria-inducible protein similar to *Drosophila easter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12220-12225
- Johnson K. S., Felton G. W. (1996): Physiological and dietary influences on midgut redox conditions in generalist lepidopteran larvae. *J. Insect Physiol.* 42 (3), 191-198
- Johnson K. S., Felton G. W. (1996b): Potential influence of midgut pH and redox potential on protein utilization in insect herbivores. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32, 85-105
- Johnson K. S., Barbehenn R. V. (2000): Oxygen levels in the gut lumens of herbivorous insects. *J. Insect Physiol.* 46, 897-903

- Johnston K. A., Lee M. J., Gatehouse J. A., Anstee J. H. (1991): The partial purification and characterisation of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem.* 21, 389-397
- Kappler A., Brune A. (2002): Dynamics of redox potential and changes in redox state of iron and humic acids during gut passage in soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). *Soil Biol. Biochem.* 34, 221-227
- Karrowe D. N., Martin M. M. (1993): Determinants of diet quality: the effects of diet pH, buffer concentration and buffering capacity on growth and food utilization by larvae of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *J. Insect Physiol.* 39, 47-52
- Keating S. T., Yendol G. W., Schultz J. C. (1988): Relationship between susceptibility of gypsy moth larvae (Lepidoptera: Lymantriidae) to a baculovirus and host plant foliage constituents. *Envir. Ent.* 17, 952-958
- Keating S. T., McCarthy W. J., Yendol W. G. (1989): Gypsy moth (*Lymantria dispar*) larval susceptibility to a baculovirus affected by selected nutrients, hydrogen ions (pH), and plant allelochemicals in artificial diets. *J. Invert. Pathol.* 54, 165-174
- Kempken F., Kempken R. (2000): *Gentechnik bei Pflanzen*. Springer Verlag, ISBN 3-540-67547-7
- Kleemann S. G., Keung W. M., Riordan J. F. (1986): Metal binding to angiotensin converting enzyme: implications for the metal binding site. *J. Inorg. Biochem.* 26, 93-106
- Knowles B. H., Dow J. A. T. (1993): The Crystal δ -Endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for Their Mechanism of Action on the Insect Gut. *BioEssays* 15, 469-476
- Köhler D., Kruse M., Stöcker W., Sterchi E. E. (2000): Heterologously overexpressed, affinity-purified human meprin alpha is functionally active and cleaves components of the basement membrane in vitro. *FEBS Letters.* 465, 2-7
- Koppenhöfer A. M., Kaya H. K. (1997): Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for Scarab grub control. *Biol. Contr.* 8, 131-137
- Kozak E. M., Tate S. S. (1982): Glutathione-degrading enzymes of microvillus membranes. *J. Biol. Chem.* 257, 6322-6327
- Lam W., Coast G. M., Rayne R. C. (2000): Characterisation of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 30, 85-94
- Larson R. A. (1988): The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27, 969-978
- Lecadet M. M., Dedonder R. (1967): Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by proteases of *Piers brassicae*. *J. Invert. Pathol.* 9, 310-321
- Lee K. E., Wood T. G. (1971): *Termites and soils*. Academic press, New York
- Lemos F. J. A., Terra W. R. (1992): Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22, 613-619
- Levinsky H., Birk Y., Applebaum S. W. (1977): Isolation and characterization of a new trypsin-like enzyme from *Tenebrio molitor* L. larvae. *Int. J. Pept. Protein Res.* 10, 252-264
- Levot G. W. (1995): Resistance and the control of sheep ectoparasites. *Int. J. Parasitol.* 25, 1355-1362
- Li J., Carroll J., Ellar D. J. (1991): Crystal structure of Insecticidal δ -Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å Resolution. *Nature* 353, 815-821
- Lovley D. R., Coates J. D., Blunt-Harris E. L., Phillips E. J. P., Woodward J. C. (1996): Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382, 445-448

- Manker D. C., Lidster W. D., Starnes R. L., McIntosh S. C. (1994): World Intellectual Property Organization patent WO 94/09630
- Maroux S., Louvard D., Baratti J. (1973): The aminopeptidase from hog intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321, 282-295
- McGaughey W. H., Oppert B. (1998): Mechanisms of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Israel J. Entomol.* 32, 1-14
- McGaughey W. H., Gould F., Gelernter W. (1998b): BT resistance management. *Nature Biotechnology* 16, 144-146
- McGhie T. K., Christeller J. T., Ford R., Allsopp P. G. (1995): Characterization of midgut proteinase activities of white grubs: *Lepidiota noxia*, *Lepidiota negatoria*, and *Antitrogus consanguineus* (Scarabaeidae, Melolonthini). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 28, 351-363
- McIntosh S. C., Stone T. B., Jokerst R. S., Fuchs R. L. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8930-8933
- Milne R., Kaplan H. (1993): Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23 (6), 663-673
- Milne R., Wright T., Kaplan H., Dean D. (1998): Spruce budworm elastase precipitates *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by specifically recognizing the C-terminal region. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 28, 1013-1023
- Minami M., Hori H., Ogiwara K., Sato R., Ohba M., Iwahana H. (1995): Deletion mutants of the gene encoding delta-endotoxin specific to scarabaeid beetles: minimum region of the gene required to express the activity. *Biosc. Biotech. Biochem.* 59(7), 1381-1383
- Moar W. J., Pusztai-Carey M., Van Faassen H., Bosch D., Frutos R., Rang C., Luo K., Adang M. J. (1995): Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC Resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2086-2092
- Moore W. M., Spilburg C. A. (1986): Peptide hydroxamic acids inhibit skin collagenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 390-395
- Murray R. M., Bryant A. M., Leng R. A. (1976): Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *Br. J. Nutr.* 36, 1-4
- Ogiwara K., Indrasith L. S., Asano S., Hori H. (1992): Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 121-126
- Ogiwara K., Hori H., Minami M., Takeuchi K., Sato R., Ohba M., Iwahana H. (1995): Nukleotide Sequence of the Gene Encoding Novel Delta-Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* Strain Buihui Specific to Scarabaeid Beetles. *Curr. Microbiol.* 30, 227-235
- Ohba M., Iwahana H., Asano S., Suzuki N., Sato R., Hori H. (1992): A Unique Isolate of *Bacillus thuringiensis* Serovar *japonensis* with a High Larvicidal Activity Specific for Scarabaeid Beetles. *Letters in Appl. Microbiol.* 14, 54-57
- Oppert B., Kramer K. J., Johnson D., Upton S. J., McGaughey W. H. (1996): Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) protoxin. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26, 571-583
- Oppert B., Kramer K. J., McGaughey W. H. (1997): Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *The Chemist* January/February, 7-10
- Oppert B. (1999): Review: Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42, 1-12

- Paré P. W., Alborn H. T., Tumlinson J. H. (1998): Concerted biosynthesis of an insect elicitor of plant volatiles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13971-13975
- Peterson A. M., Barillas M. C., Wells M. A. (1994) Sequence of three cDNAs encoding an alkaline midgut trypsin from *Manduca sexta*. Insect Biochem. Molec. Biol. 24, 463-471
- Powning R. F., Day M. F., Irzykiewicz H. (1951): Studies on the digestion of wool by insects. II. The properties of some insect proteinases. Aust. J. Sci. Res. B4, 49-63
- Rawlings N. D., Barrett A. J. (1993): Evolutionary families of peptidases. Biochem. J. 290, 205-218
- Reddy S. T., Venkateswerlu G. (1997): Intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* detection and analysis by gelatin zymography. Biochem. Molec. Biol. Int. 43 (5), 935-943
- Reeck G., Oppert B., Denton M., Kanost M., Baker J. E., Kramer K. J. (1999): Insect proteinases. In: V. Turk (ed.), Proteases: New perspectives. Birkhauser Verlag, Basel Boston Berlin, 125-148
- Ritter H. (1961): Glutathione-controlled anaerobiosis in *Cryptocercus*, and its detection by polarography. Biol. Bull. 121, 330-346
- Sacchi V. F., Parenti P., Hanozet G. M., Giordana B., Luthy P., Wolfersberger M. G. (1986): *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. FEBS Lett. 204 (2), 213-218
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989): Molecular Cloning, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schachtschnabel P., Blume H.-P., Brümmer G., Hartge K. H., Schwertmann U. (1998): Lehrbuch der Bodenkunde. Ferdinand Enke, Stuttgart
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R., Dean D. H. (1998): *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Molec. Biol. Rev., 775-806
- Schnepf H. E., Whiteley H. R. (1985): Protein toxins of Bacilli. In Hoch J. A., Setlow P. (ed.), Molecular biology of microbial differentiation. American Society for Microbiology, Washington D. C., 209-216
- Schnetter W., Mittermüller R., Fröschle M. (1996): Control of the Cockchafer *Melolontha melolontha* in the Kraichgau with NeemAzal/TS. IOBC uprs Bulletin Vol 19(2)
- Schnetter W., Wagner W. (2002): Bakterien als Antagonisten von Maikäfer-Engerlingen. Laimburg Journal 1(2), in press
- Schwenke W. (1974): Die Forstschädlinge Europas. 2. Band: Käfer; Verlag Paul Parey
- Sekar V., Thompson D. V., Maroney M. J., Bookland R. G., Adang M. J. (1987): Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84, 7036-7040
- Shahidi F., Janitha P. K., Wanasundara P. D. (1992): Phenolic antioxidants. Critical Rev. In Food Sci. Nutr. 32, 67-103
- Spiteller D., Dettner K., Boland W. (2000): Gut Bacteria may be involved in Interactions between Plants, Herbivores and Their Predators: Microbial Biosynthesis of N-Acylglutamine Surfactants and Elicitors of Plant Volatiles. Biol. Chem. 381, 755-762
- Stabb E. V., Jacobson L. M., Handelsman J. (1994): Zwittermycin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. Appl. Environ. Microbiol. 60, 4404-4412
- Sterchi E. E., Stöcker W. (1999): Proteolytic Enzymes – Tools and Targets. Springer. ISBN 3-540-61233-5

- Stöcker W., Wolz R. L., Zwilling R., Strydom D. J., Auld D. S. (1988): Astacus protease, a zinc metalloenzyme. *Biochem.* 27, 5026-5032
- Stöcker W., Ng M., Auld D.S. (1990): Fluorescent oligopeptide substrates for kinetic characterization of the specificity of Astacus protease. *Biochem.* 29, 10418-10425
- Stöcker W., Gomis R. F., Bode W., Zwilling R. (1993): Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *Eur. J. Biochem.* 214, 215-231
- Stöcker W., Zwilling R. (1995): Astacin. *Methods Enzymol.* 248, 305-325
- Streitwieser A. (1986): *Organische Chemie*. 2. Auflage, ISBN 3-527-25810-8
- Sugimura M., Sato R., Iwahana H. (1997): Unusual Proteolytic Processing of a Delta-Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* Strain Buibui by Larval Midgut-Juice of *Anomala cuprea* Hope (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Entomol. Zool.* 32, 533-540
- Suzuki N., Hori H., Asano S. (1993): Sensitivity of Cupreous Chafer, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae), in Different Larval Stages to *Bacillus thuringiensis* Serovar *japonensis* Strain Buibui. *Appl. Entomol. Zool.*, 28 (3), 403-405
- Suzuki N., Hori H., Tachibana M., Asano S. (1994): *Bacillus thuringiensis* Strain Buibui for Control of Cupreous Chafer, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae), in Turfgrass and Sweet Potato. *Biological Control* 4, 361-365
- Suzuki N., Hori H., Tachibana M., Indrasith S., Fujiie A. (1994b): Residual Effects of the Toxin from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* Strain Buibui in the Soil. *Appl. Entomol. Zool.* 29 (4), 610-613
- Terra W. R. (1988): Physiology and biochemistry of insect digestion: An evolutionary prospective. *Physiol. J. Med. Biol. Res.* 21, 675-734
- Turunen S. (1979): Lipid digestion and uptake in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 63A, 455-460
- Valaitis A. P. (1995): Gypsy moth midgut proteinases: purification and characterization of luminal trypsin, elastase and the brush border membrane leucine aminopeptidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 139-149
- Venkateswerlu G., Stotzky G. (1990): Simple method for the isolation of the antilepidopteran toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12, 245-251
- Veviers P. C., O'Brien R. W., Slaytor M. (1982): Pole of bacteria in maintaining the redox potential in the hindgut of termites and preventing entry of foreign bacteria. *J. Insect Physiol.* 28, 947-951
- Wagner W. (1999): Untersuchungen zur Wirkungsweise von *Bacillus thuringiensis* ssp. *japonensis* gegen *Melolontha melolontha* (Scarabaeidae). Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- Wagner W., Krieger L., Schnetter W. (2000): Why is the scarab specific *Bacillus thuringiensis* ssp. *japonensis* strain Buibui inefficient against *Melolontha melolontha*? Integrated Control of Soil Pest, subgroup "Melolontha", IOBC wprs Bulletin 23 (8), 55-60
- Wagner W., Schnetter W. (2001): Proteasen im Darmsaft des Feldmaikäfers (*Melolontha melolontha*) und Abbau des Cry8C-Toxins von *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui, *Mitt. DGaaE* 13, 169-172
- Wagner W., Möhrle F., Schnetter W. (2002): Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32 (7), 803-814
- Wagner W., Schnetter W. (2002b): Proteolytic activation and inactivation of Cry8C from *Bacillus thuringiensis japonensis* Buibui by proteolytic enzymes in the midgut juice of *M. melolontha*. Integrated Control of Soil Pest, subgroup "Melolontha", IOBC wprs Bulletin, in press

- Walters F. S., English L. H. (1995): Toxicity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. *Entomol. Experiment. Appl.* 77, 211-216
- Ward C. W. (1975): Resolution of proteases in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth *Tineola bisselliella*. *Aust. J. Biol. Sci.* 13, 59-68
- Wasano N., Yasunaga-Aoki C., Sato R., Ohba M., Kawarabata T., Iwahana H. (2000): Spherical parasporal inclusions of the Lepidoptera-specific and Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains: A comparative electron microscopic study. *Cur. Microbiol.* 40, 128-131
- Waterhouse D. F. (1951): Studies on the digestion of wool by insects. VI. The pH and oxidation-reduction potential of the alimentary canal of the clothes moth larva (*Tineola bisselliella* (Humm.)). *Aust. J. Sci. Res.* B5, 169-77
- Waterhouse D. F. (1952): Studies on the digestion of wool by insects. VII. Some features of digestion in three species of dermestid larvae and a comparison with *Tineola* larvae. *Aust. J. Sci. Res.* B5, 444-459
- Wiedemann J. F. (1930): Die Celluloseverdauung bei Lamelliconierlarven. *Z. Morph. Ökol. Tiere* 19, 228-258
- Wolfersberger M., Luethy P., Maurer A., Parenti P., Sacchi F. V., Giordana B., Hanozet G.M. (1987): Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 86, 301-308
- Wolz R. L., Zeggaf C., Stocker W., Zwilling R. (1990): Thiol containing compounds and amino acid hydroxamates as reversible synthetic inhibitors of *Astacus* protease. *Arch. Biochem. Biophys.* 281, 275-281
- Yiallourous I., Vassiliou S., Yiotakis A., Zwilling R., Stocker W., Dive V. (1998): Phosphinic peptides, the first potent inhibitors of astacin, behave as extremely slow-binding inhibitors. *Biochem. J.* 331, 375-379
- Yoshimura T., Tobata H., Nishio M., Die E., Yamaoka R., Hayashiya K. (1988): L-Cysteine lyase of the webbing clothes moth, *Tineola bisselliella*. *Insect Biochem.* 18, 771-777
- Zhang J., Hodgman T. C., Krieger L., Schnetter W., Schairer H. U. (1997): Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* 179, 4336-4341